

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität
München
(Direktor: Prof. Dr. H. J. Möller)

Die Regulation des homomeren 5-HT₃-Rezeptors als Beispiel für einen Agonist-induzierten Offenkanalblock

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Michaela Beyerle
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupprecht
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Konnerth Priv. Doz. Dr. M. Dichgans
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. G. Hapfelmeier
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr.h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	13.05.2004

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1.	<i>Einleitung</i>	7
2.	<i>Theoretische Grundlagen</i>	9
2.1.	Der 5-HT₃-Rezeptor	9
2.1.1.	Physiologie	9
2.1.2.	Psychopharmakologische Bedeutung des 5-HT ₃ -Rezeptors	13
2.1.3.	Der homomere 5-HT _{3A} -Rezeptor als Modell für den 5-HT ₃ -Rezeptor	13
2.1.3.1.	Mechanismen bei Aktivierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors	13
2.1.3.2.	Mechanismen bei Inaktivierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors	14
2.2.	Expression von Rezeptoren	15
2.3.	Transfektionsmethoden	17
2.4.	Die Patch-Clamp-Methode	20
2.4.1.	Technische Grundlagen	20
2.4.2.	Applikationsverfahren	22
2.5.	Kinetische Modellierung Liganden-gesteuerter Ionenkanäle	23
2.5.1.	Beispiel 1: Die Desensitisierung eines Glutamat-Rezeptors	25
2.5.2.	Beispiel 2: Der spannungsabhängige Offenkanalblock eines Azetylcholin-Rezeptors	26
3.	<i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	28
4.	<i>Material und Methoden</i>	29
4.1.	Zellkultur und Rezeptorexpression	29
4.2.	Elektrophysiologie	30
4.2.1.	Messelektroden	30
4.2.2.	Die Whole-Cell-Konfiguration	30
4.2.3.	Applikationsverfahren	31
4.2.4.	Verwendete Lösungen	33
4.2.5.	Aufnahmesystem, Messgrößen und Auswertung	34
4.2.6.	Computersimulationsprogramm	35
5.	<i>Ergebnisse</i>	37
5.1.	Die Serotonin-Dosis-Wirkungskurve am humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor	37
5.2.	Die Erholungskinetik nach Desensitisierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors	40
5.3.	Die schnelle Agonistenapplikation	42
5.4.	Die Spannungsabhängigkeit bei Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors	43
5.5.	Die Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors durch mCPBG	45
5.6.	Die Entwicklungsschritte zum Simulationsmodell	48
5.6.1.	Das Simulationsmodell ohne Block	48

5.6.2.	Das Simulationsmodell mit einem Block.....	49
5.6.3.	Endfassung des Simulationsmodells für den 5-HT _{3A} -Rezeptor.....	52
6.	<i>Diskussion</i>	54
6.1.	Die Desensitisierung am 5-HT _{3A} -Rezeptor.....	54
6.2.	Die Effekte von mCPBG auf den 5-HT _{3A} -Rezeptor	56
6.3.	Die physiologische Bedeutung des Agonist-induzierten Offenkanalblocks	57
6.4.	Inwieweit beschreibt das kinetische Modell den 5-HT _{3A} -Rezeptor	57
6.5.	Was bringt die kinetische Modellierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors für das Verständnis serotoninerger Mechanismen.....	59
7.	<i>Zusammenfassung</i>	60
8.	<i>Literaturverzeichnis</i>	62
9.	<i>Verzeichnis der Abbildungen</i>	71
10.	<i>Danksagungen</i>	72
11.	<i>Anhang</i>	73
11.1.	Lösungen, Chemikalien, Medien	73
11.2.	Verbrauchsmittel	74
11.3.	Geräte.....	75
12.	<i>Lebenslauf:</i>	76

Verwendete Abkürzung:

A	Agonist
ACh	Azetylcholin
B	blockierter Zustand des Rezeptors
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximal-effektive Konzentration (eines Agonisten)
GABA	γ -Aminobuttersäure
Glu	Glutamat
HEK	humane embryonale Nierenzellen
5-HT	5-Hydroxytryptamin
IC ₅₀	halbmaximal-inhibitorische Konzentration (eines Agonisten)
K _{on}	Assoziationskonstante
K _{off}	Dissoziationskonstante
Leu	Leucin
M	Molar (mol/l)
mCPBG	Methylcyclophenylbiguanid
M ⁻¹ s ⁻¹	Einheit der Bindungs-Raten-Konstanten
n	Anzahl der gewerteten Experimente
nH	Hill-Koeffizient
pA	pico Amper
R	geschlossener Zustand des Rezeptors (resting state)
RA	geschlossener Zustand des Rezeptors bei gebundenem Agonist
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
s ⁻¹	Einheit bei Raten-Konstanten
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
ZNS	Zentrales Nervensystem

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

1. Einleitung

Störungen des serotoninergeren Systems sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung von psychiatrischen Krankheiten, insbesondere affektiver Störungen, beteiligt (Möller, 1995). Die in diesem Zusammenhang immer wieder erwähnte „Serotonin-Hypothese“ propagiert einen Transmittermangel innerhalb des serotoninergeren Systems mitunter als Ursache dafür. Inwieweit eine direkte Beeinflussung der Funktion von Serotonin-Rezeptoren in der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen eine Rolle spielt, ist immer noch unklar. Unklar v. a. auch deswegen, weil die Regulationsmechanismen einiger Rezeptoren (z.B. dem 5-HT₃-Rezeptor) aus dem serotoninergeren System immer noch nicht verstanden sind. Ein Vertreter aus dem serotoninergeren System, der 5-HT_{3A}-Rezeptor, soll hier deswegen bzgl. seiner kinetischen Eigenschaften näher untersucht werden.

Der 5-HT_{3A}-Rezeptor gehört zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (Ortells und Lunt 1995, Yakel, 1992). Er zeigt eine ausgeprägte Kationenselektivität, indem er überwiegend für monovalente Kationen wie z.B. Na⁺ und K⁺, aber in geringeren Maß auch für Ca²⁺ und Mg²⁺ durchlässig ist (Yang, 1990; Hargreaves et al. 1994). Unter physiologischen Bedingungen vermittelt er Einwärtsströme, die eine Membrandepolarisation bewirken. In der Literatur wird das Vorkommen von präsynaptischen und postsynaptischen 5-HT_{3A}-Rezeptoren beschrieben. Während die Funktion der präsynaptischen Rezeptoren vermutlich in der Regulation der Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter wie z.B. Dopamin und GABA liegt (van Hooft und Vijverberg, 2000; Koyama et al., 2000), wird den postsynaptischen Rezeptoren selbst eine erregende synaptische Transmission in mehreren verschiedenen Arealen des Gehirns zugeschrieben (Sugita et al., 1992; Roerig et al., 1997). 1991 wurde die erste Untereinheit des 5-HT₃-Rezeptors, der homomere 5-HT_{3A}-Rezeptor kloniert (Mariq et al., 1991). Er bildet in heterologen Expressionssystemen homo-pentamere Protein-Komplexe, die vermutlich viele pharmakologische und funktionelle Eigenschaften der nativen neuronalen 5-HT₃-Rezeptoren teilen.

Der Agonist Serotonin induziert über Rezeptorbindung eine schnelle Aktivierung des Rezeptors, bei der es zur Öffnung des Ionenkanals kommt. Das Schließen des Kanals erfolgt über Rezeptor-Deaktivierung oder Desensitisierung (Jones und Westbrook, 1996). Bei der Desensitisierung handelt es sich dabei um eine typische Eigenschaft der meisten Liganden-

gesteuerten Ionenkanäle. Die Desensitisierung spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Beendigung der postsynaptischen Antwort, denn durch den bestehenden inaktiven Zustand des Rezeptors ist es möglich die Synapse vor weiteren Impulsen zu schützen und somit ihre Antwortmöglichkeit deutlich zu beeinflussen (Huganir et al., 1986; Jones und Westbrook, 1996). Somit könnte die Desensitisierung ein wichtiger Mechanismus der Kurzzeit-Regulation synaptischer Effizienz sein. Die molekularen Grundlagen der Desensitisierung sind bisher noch wenig verstanden. Ein kleiner Schritt in diese Richtung gelang mit der 2002 erschienenen Veröffentlichung über den ionotropen Glutamat-Rezeptor (Sun et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den kinetischen Eigenschaften der Aktivierung, der Desensitisierung und der Resensitisierung des humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors und versucht diese ausgehend von elektrophysiologischen Messungen mittels eines kinetischen Modells zu beschreiben.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Der 5-HT₃-Rezeptor

Im serotoninen System können mittlerweile sieben verschiedene Rezeptorsubtypen (5-HT₁₋₇-Rezeptor) unterschieden werden, die ihrerseits insgesamt 14 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche Subtypen bilden (Barnes und Sharp, 1999). Dem 5-HT₃-Rezeptor, der in dieser Arbeit von besonderem Interesse ist, wird eine Vielzahl von zentralen Funktionen zu Teil. Er hat Einfluss auf Emesis, Entzündungsantworten, Denkprozesse, Affekt und Sucht (Dubin et al., 1999).

2.1.1. Physiologie

Der 5-HT₃-Rezeptor spielt in der Familie der Serotoninrezeptoren eine Außenseiterrolle. Alle serotoninen Rezeptorsubtypen bis auf den 5-HT₃-Rezeptor sind G-Protein gekoppelt, verfügen meist über ein 7 Helix-Motiv und ihre Signaltransduktion wird über Second-Messenger reguliert. Man zählt sie zu den metabotropen Rezeptoren (Barnes und Sharp, 1999).

5-HT₃-Rezeptoren sind hingegen schnell aktivierbare, Liganden-gesteuerte Kationenkanäle. Kennzeichnend für ionotrope Rezeptoren ist, dass Rezeptor und Ionenkanal aus dem selben Protein bestehen. Der spezifische Neurotransmitter bewirkt somit direkt, d.h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskade, eine Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanalproteins und damit die Öffnung des Kanals (Petrides, 1997). Einen sehr engen strukturellen Verwandtschaftsgrad weist der 5-HT₃-Rezeptor zu dem ACh-, dem GABA_A- und dem Glycin-Rezeptor auf. Sie gehören alle zur "Cys-Cys loop ligand-gated ion channel superfamily" (Maricq et al., 1991; Belelli et al., 1995). Die 5-HT₃ Rezeptoren sind permeabel für Kationen, besonders für die einwertigen Na⁺ und K⁺-Ionen (Yang et al., 1990) und in sehr geringem Maß auch für Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen (Yang et al., 1990; Hargreaves et al., 1994). Aufgebaut ist der 5-HT₃-Rezeptor aus einem pentameren Proteinkomplex bestehend aus fünf homologen Untereinheiten, die eine ionenpermeable Pore innerhalb der Zellmembran bilden (siehe Abb. 2.1.1.-1). Die Untereinheiten verfügen jeweils über vier Segmente (transmembranäre Domänen TM₁₋₄), die v.a. hydrophobe Aminosäuren enthalten und somit eine Stabilisierung innerhalb der Lipidmembran darstellen. Jede Untereinheit besitzt

wiederum ein extrazelluläres N-Terminal und C-Terminal (siehe Abb. 2.1.1.-2). Das glykosilierte N-Terminal fungiert als Bindungsstelle für Serotonin (Eiselé et al., 1993). Die aus Aminosäuren bestehende Verbindungen zwischen den Segmenten TM₁ und TM₂, sowie TM₃ und TM₄ liegen intrazellulär und werden als "short-loops" bezeichnet, während hingegen die Verbindung zwischen TM₂-TM₃ extrazellulär liegt. Wie bei dem ACh-Rezeptor formen die TM₂-Segmente eine α -Helix und begrenzen das Lumen der Pore (Unwin, 1993). Die α -Helix weist einen Knick in der TM₂ bei Leu 251 auf, wodurch der Kanal geschlossen wird. Bei Aktivierung des Kanals kommt es zu einer Rotation der TM₂-Segmente und der Kanal öffnet sich.

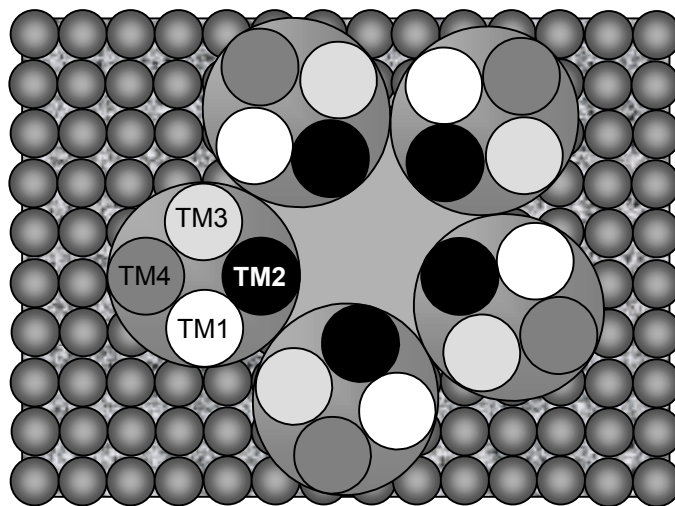


Abb. 2.1.1-1: Quartärstruktur eines Ionenkanals: Die fünf homologen Untereinheiten bilden eine Ionen-permeable Pore (frei nach Waxham, 1999).

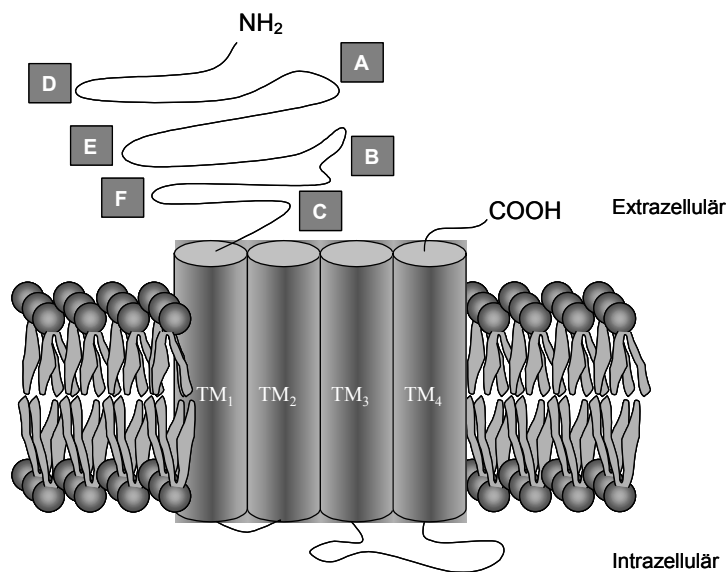


Abb. 2.1.1-2: Schematische Darstellung der transmembranären Domänen (TM₁₋₄) eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals vom ACh-Typ. N- und C- Terminal liegen extrazellulär (modifiziert nach Waxham, 1999).

Im Vergleich zu anderen Rezeptoren aus dem serotoninergeren System sind bei den 5-HT₃-Rezeptoren nur wenige Untergruppen bekannt. Der 5-HT₃-Rezeptor kommt funktionell als Homomer oder in Verbindung mit dem 5-HT_{3B}-Rezeptor als Heteromer vor (Davies et al., 1999). 1991 wurde bei Mäusen die aus 487 Aminosäuren (56 kDa) bestehende erste Rezeptoruntereinheit 5-HT_{3A} kloniert (Maricq et al., 1991). Es wurden daraus alternative Splice-Varianten entwickelt: eine Langform (5-HT_{3AL}) sowie eine Kurzform (5-HT_{3AS}). Die Splicemöglichkeit besteht jedoch nicht beim humanen Genom. 1995 konnte die erste humane 5-HT_{3A}-Rezeptoruntereinheit geklont werden (Belelli et al., 1995). Innerhalb der verschiedenen Spezies (Mensch und Nager) gab es eine Übereinstimmung bzgl. der Aminosäuresequenz von ungefähr 85% (Hanna et al., 2000). Mittlerweile wurde für verschiedene Spezies (Mensch, Maus, Ratte) der 5-HT_{3B}-Rezeptor entschlüsselt, der funktionell nur als Heteromer vorkommt (Dubin et al., 1999; Davies et al., 1999). Die Rezeptoruntereinheit 5-HT_{3B} hat mit dem homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor eine Aminosäure-übereinstimmung von 41% (Davies et al., 1999; Hanna et al., 2000) und weist über viele pharmakologische und funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Diese Untereinheit spielt vermutlich bei den verschiedenen Spezies in vivo eine wichtige funktionelle Rolle.

Durch Radioliganden gelang es die Verteilung des 5-HT₃-Rezeptors im ZNS zu erfassen. Die höchste Rezeptordichte wurde im Hirnstamm gefunden. Diese Region ist bei Initiation und Koordination des Brechreizes beteiligt. Sie beinhaltet den Nucleus tractus solitarius, die Area postrema und den dorsalen motorischen Vaguskern. Das Fehlen von mRNA des 5-HT₃-Rezeptors im Bereich der Area postrema und im Nucleus tractus solitarius lässt auf eine präsynaptische Lokalisation schließen (Pratt und Bowery, 1989). Eine wesentlich geringere Rezeptorexpression fand man im Bereich des Vorderhirns. Hier befinden sich die höchsten Konzentrationen im Hippocampus, den Amygdala und den oberflächlichen zerebralen Kortexschichten. Allerdings gibt es Variationen zwischen den verschiedenen Spezies. Bei den meisten Spezies (z.B. Mensch, Maus, Ratte) liegt die höchste Rezeptorexpression des Vorderhirns im Hippocampus (Barnes und Sharp, 1999; Parker et al., 1996). Trotz unterschiedlicher Methoden stimmen die frühen Daten zur Lokalisation des 5-HT₃-Rezeptors größtenteils überein mit den später gewonnenen Daten. Unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern wurde es möglich 5-HT₃-Rezeptoren auf zellulärer Ebene zu bestimmen. 5-HT₃-Rezeptoren sind prä- und postsynaptisch lokalisiert. Die Eigenschaften der prä- und postsynaptischen 5-HT₃-Rezeptoren lassen sich unterscheiden. So kommt es bei Aktivierung der postsynaptischen 5-HT₃-Rezeptoren zu einer erregenden synaptischen Transmission, wie z.B. bei den lateralen Amygdala (Sugita et al., 1992) und dem visuellen Kortex (Roerig et al., 1997). Die präsynaptischen Rezeptoren sind hingegen mit unter an der Regulation weiterer Transmittersysteme wie dem Dopamin- oder dem GABA-System beteiligt (van Hooft und Vijverberg, 2000; Koyama et al., 2000).

Interessanterweise wurden 5-HT₃-Rezeptoren nicht allein auf serotoninerger Neuronen, sondern z.B. auch auf GABAergen Interneuronen des zerebralen Kortex wie auch des Hippocampus gefunden (Morales et al., 1996). So vermittelt der 5-HT₃-Rezeptor indirekt eine Hemmung exzitatorischer Kortexneurone über die Erregung GABAerger Interneurone (Tecott et al., 1993). Diese 5-HT₃-Rezeptoren befinden sich allerdings nur in der Untergruppe der GABAergen Interneurone, die in der Hippocampusregion CA1-CA3 vorkommt und die das Ca²⁺-Bindungsprotein Calbidin enthält (Morales et al., 1996; McMahon und Kauer, 1997).

2.1.2. Psychopharmakologische Bedeutung des 5-HT₃-Rezeptors

In vivo und in vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass 5-HT₃-Rezeptoren eine Reihe unterschiedlicher physiologischer Abläufe steuern. So bewirkt eine Aktivierung dieser Rezeptoren z.B. eine erhöhte Aktivität viszero-affektiver Neurone, die klinisch zu Nausea und Vomitus führen. Weiter ist bekannt, dass es bei Aktivierung von 5-HT₃-Rezeptoren über direkte wie auch indirekte Prozesse zu vermehrter Freisetzung von 5-HT, GABA und Dopamin kommt, hingegen zu einer Hemmung in der Ausschüttung von ACh (Barnes und Sharp, 1999). Über das serotoninerge System kann deshalb in verschiedene Prozesse des ZNS eingegriffen, bzw. diese moduliert werden. Hinweise auf eine anxiolytische Wirkung von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten gibt die Arbeit von Jones und Piper, (1994). Eine antipsychotische Potenz von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten lässt sich durch die Wirkung von Clozapin erklären (Brunello et al., 1995). Außerdem wird in der Literatur den 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten eine cholinerge Wirkung zugeschrieben, die bekanntlich die kognitive Leistung verbessern soll (Costall und Naylor, 1994).

2.1.3. Der homomere 5-HT_{3A}-Rezeptor als Modell für den 5-HT₃-Rezeptor

2.1.3.1. Mechanismen bei Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors

Wie bereits beschrieben, fungiert das glykosilierte N-Terminal als Bindungsstelle für den Neurotransmitter Serotonin (Eiselé et al., 1993). Durch die Bindung von 2 Molekülen an den Rezeptor kommt es direkt zu einer Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanalproteins und somit zur Kanalöffnung. Dieser Prozess verläuft ohne zwischengeschaltete Signalkaskade. Die Öffnung ermöglicht schließlich den Ionenfluss. Der bestuntersuchtete Rezeptor unter den ionotropen Rezeptoren ist der ACh-Rezeptor. Untersuchungsergebnisse zu diesem Rezeptor gelten als übertragbar auf andere Rezeptoren dieser Gruppe. Beim ACh-Rezeptor wird die Bindung des Agonisten innerhalb der α -Untereinheit des Rezeptors durch zwei benachbarte Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden, vermittelt. Diese Struktur findet man auch bei anderen ionotropen Rezeptoren. Die Transmitterbindung vermittelt

schließlich eine Konformationsänderung des Kanalproteins im Sinne einer Rotation der TM₂-Segmente um ihre Längsachse, sodass es zur Öffnung der Kanalpore kommt. Der Ionenfluss folgt entlang seines elektrochemischen Gradienten. Die Begrenzung der Pore durch die TM₂-Segmente hat Einfluss auf den Ionenfluss. Die Ausrichtung der TM₂-Segmente ist so angelegt ist, dass 3 Ringe negativ geladener Aminosäuren die Pore umschließen. Dadurch können nur Kationen den Kanal passieren, während Anionen wegen ihrer Ladungsabstoßung weitgehend ausgeschlossen werden (Waxham, 1999). Dies ermöglicht den Ionenfluss von Na⁺-, K⁺- und in sehr geringen Mengen auch Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen. Der 5-HT₃-Rezeptor besitzt eine dem ACh-Rezeptor sehr ähnliche Ionenselektivität. Im Vergleich zu anderen ionotropen Rezeptoren verläuft der Prozess der Aktivierung beim 5-HT₃-Rezeptor langsam.

2.1.3.2. Mechanismen bei Inaktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors

Das Versiegen des Ionenflusses durch aktivierte Ionenkanäle kann über zwei sehr unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Bei der Deaktivierung des Rezeptors geschieht dies über Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor d.h. nachdem die Bindungsstelle wieder frei ist, nimmt der Ionenfluss ab. Ein weiterer Mechanismus, der zur Abnahme des Ionenflusses nach Aktivierung des Rezeptors führt, ist die Desensitisierung. Dieser Mechanismus ist vielen Ionenkanälen gemeinsam. Man versteht darunter eine Inaktivierung der Kanäle unter Anwesenheit des Agonisten. Bei einigen Transmittersystemen ist dieser Mechanismus entscheidend für die zeitliche Begrenzung der postsynaptischen Rezeptorantwort. Somit ist es möglich die Stärke einer transmittervermittelten synaptischen Übertragung zu steuern (Jones und Westbrook, 1996). Mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen kann man die Rezeptor-Desensitisierung erfassen. Dazu werden Transmitter-induzierte Stromantworten in einem Strom-Zeit-Diagramm aufgetragen. Als Zeichen der Desensitisierung wird ein Stromabfall bei Anwesenheit (Bindung) des Agonisten gewertet. Der Stromabfall lässt sich anhand einer Exponentialgleichung beschreiben und mittels einer Zeitkonstante quantifizieren. Die Desensitisierung kann sowohl mono- als auch biphasisch verlaufen. Ein biphasischer Verlauf setzt sich aus einer schnelleren und einer langsameren Zeitkonstante zusammen. Die genauen Mechanismen der Rezeptor- Desensitisierung sind allerdings noch nicht bekannt. Durch den Mechanismus der Desensitisierung gerät der Rezeptor in einen insensitiven Zustand, indem er nicht aktivierbar ist. Die Dauer dieses Zustandes bis zu wieder vollständigen Aktivierung des Rezeptors (maximale Stromantwort)

ist abhängig vom jeweiligen Rezeptor und wird als Resensitisierungs-Zeit bezeichnet. Somit wird über die Resensitisierungs-Zeit des Rezeptors die Fähigkeit der Synapse Aktionspotentiale in einer bestimmten Frequenz an das nächste Neuron weiter zu übertragen reguliert (Jones und Westbrook, 1996).

Verschiedene Faktoren können Einfluss nehmen auf das Ausmaß der Desensitisierung. So beeinflussen z.B. die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Gunthorpe et al., 2000; Lobitz et al., 2001; Yakel et al., 1996) sowie der Differenzierungsgrad der transfizierten Zellen (Shao et al., 1991) die Desensitisierung von 5-HT₃-Rezeptoren. Auch der Austausch von Aminosäuren in der TM₂-Region kann Einfluss auf das Ausmaß der Desensitisierung nehmen (Yakel et al., 1993; Gunthorpe et al., 2000)

2.2. Expression von Rezeptoren

Ionotrope Rezeptoren zeigen durch ihre Zusammensetzung aus unterschiedlichen Untereinheiten und deren Subtypen eine enorme Vielfalt. Die Untersuchung von Ionenkanälen ist durch heterologe Expression dieser Rezeptoren in Kulturzellen möglich. Das Einbringen fremder DNA oder RNA gelingt in unterschiedlichen Expressionssystemen. Hier sollen einige Expressionssysteme vorgestellt werden.

Oozyten von *Xenopus laevis*:

Man kann sowohl cDNA als auch mRNA von bestimmten Rezeptoren direkt in unbefruchtete Oozyten von *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch) injizieren. Nach mehrtägiger Inkubation exprimieren die Zellen bereits die Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Gewinnung als auch Handhabung der Oozyten. Zudem ist die Expressionsrate der Rezeptoren hoch. Dennoch konnte sich die Verwendung von Oozyten des *Xenopus laevis* für die Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration nicht etablieren. Gründe hierfür sind der relativ große Durchmesser (ca. 1 mm), die ungleichmäßige Verteilung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche (z.B. verstärkt an der Injektionsstelle) und die mögliche Expression endogener Rezeptoren (Methfessel et al., 1986).

Bakterielle Expressionssysteme am Beispiel von E. coli:

Zu den am Besten untersuchten Expressionssystemen gehören E. coli-Bakterien. Mit ihnen kann eine homologe als auch heterologe Expression erzielt werden. Die cDNA wird dazu in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und schließlich in ein Bakterium transformiert. Kontrolliert wird die Expression des klonierten Gens mit einem bakteriellen Promoter. Die Expressionsrate ist sehr variabel. Nicht selten kann es zu einer Überexpression an Proteinen kommen, die in Einschlusskörperchen akkumulieren (Marston und Hartley, 1990). Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Manipulation der Bakterien sowie ihrer komplikationslosen Handhabung, - außerdem ist es eine billige Methode Proteine zu exprimieren (Mühlhardt, 2000)

Baculovirussystem:

Mithilfe von Baculoviren (z.B. Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Viren = AcMNPV), die eine doppelsträngige DNA mit einem Genom von ca. 130 kb Länge besitzen, kann man nur Insektenzellen transfizieren, da die Viruspromotoren in Säuger-Zellen weitgehend inaktiv bleiben (Carbonell et al., 1985). Die Expressionsrate ist sehr hoch (1-500 mg Protein/ Liter-Kultur), wobei überexprimierte Proteine in der Zelle trotzdem gelöst bleiben. Der Transport von Proteinen läuft bei Insekten - und Säugerzellen ähnlich ab. Somit ist die Expression von cytoplasmatischen, sekretierten und membranständigen Proteinen möglich. Auch werden bei den Insektenzellen eukaryontische Modifikationen (wie z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung oder Acylierung) beobachtet, wobei aber die Zusammensetzung z.B. der Zucker bei der Glykosylierung sich deutlich von der Zucker-Zusammensetzung der Säugerzellen unterscheidet (Mühlhardt, 2000).

Heterologe Expression in Säugerzellen:

Zellreihen von Säugern können transient oder permanent mittels unterschiedlicher Methoden transfiziert werden (siehe 2.3). Für die Expression von Säugerproteinen ist es sinnvoll Säugerzellen zu verwenden, da die Modifikationen und die Quartärstruktur der Proteine den natürlich Vorkommenden am ähnlichsten sind (Mühlhardt, 2000). Zur Transfektion eignen sich u.a. Fibroblasten, HEK-Zellen und HeLa-Zellen (humane Zervix-Carcinomzellen). Ihr Vorteil besteht v.a. in der relativ einfachen Handhabung bei der Kultivierung als auch der Transfektion. Außerdem befinden sich nur die zu untersuchenden Rezeptoren auf der Zellmembran und sind auf dieser weitgehend gleichmäßig verteilt. Voraussetzung für dieses

Expressionssystem ist ein gut funktionierendes, personalintensives Zellkulturlabor. Des Weiteren werden auch Hefen und Drosophila-Zelllinien als Expressionssysteme verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden HEK 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) verwendet.

2.3. Transfektionsmethoden

Zellen können transient oder permanent (stabil) transfiziert werden. Stabil transfiziert bedeutet, dass das fremde Gen in das Genom der Zelllinie integriert wird und somit eine relativ dauerhafte Expression garantiert. Die Expression ist nur relativ dauerhaft, weil es bei allen Zelllinien im Laufe der Zeit zu Veränderungen des Genoms kommt, wodurch sich die Eigenschaften der Zelle ändern können. Durch die Integration der fremden DNA in das Genom der zu transfizierenden Zelle ist die fremde DNA vor einem frühzeitigen Abbau innerhalb der Zelle geschützt. In Abhängigkeit von den Zellen, der Transfektionsmethode und anderen Faktoren liegt die Wahrscheinlichkeit Rezeptoren stabil zu transfizieren (nach Calciumphosphat-Transfektion oder Elektroporation) nur bei ca. 10^{-4} bis 10^{-5} (Ledley, 1995). Für die stabile Transfektion eignet sich am besten linearisierte DNA, da sie mit einer höheren Effizienz in das Genom integriert wird (Mühlhardt, 2000). Die Herstellung stabiler Zelllinien dauert etwa zwei Monate. Der Vorteil dieser Methode liegt eindeutig in der ständigen Verfügbarkeit der transfizierten Zellen. Nachteilig ist die zeit- und arbeitsaufwendige Herstellung der Zelllinie, sowie die eingeschränkte Flexibilität in der Herstellung unterschiedlicher Kombinationen von Rezeptor-Untereinheiten (Numberger und Draguhn, 1996).

Bei der transienten Transfektion wird nur eine kurzdauernde, aber hohe Expression durch die große Anzahl übertragener DNA-Moleküle erreicht. Zur transienten Transfektion wird meist eine "überdrehte" Plasmid-DNA verwendet, da die DNA in dieser Konformation mit einer höheren Effizienz transkribiert wird (Mühlhardt, 2000). Die Lebensdauer der aufgenommenen DNA ist auf wenige Tage beschränkt, da die fremde DNA danach durch die intrazellulären Enzyme abgebaut wird.

Zur Einschleusung von Fremd-DNA werden Transportvehikel benötigt, sog. Vektoren. Als Vektoren sind in der Molekularbiologie Plasmide, Phagen, Cosmide, BACs (Bacterial Artificial Chromosome), PACs (P1 Artificial Chromosome) und YACs (Yeast Artificial Chromosome) in Gebrauch (Mühlhardt, 2000). Bei der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide als Vektoren verwendet, sodass deren Herstellung kurz skizziert werden soll. Plasmide sind natürlich vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle, die als zusätzliche Chromosomen fungieren (Stryer, 1994). Sie bestehen aus einem Replikationsstart, einem Selektionsgen (meist ein Antibiotikaresistenz-Gen) und einer Klonierungsstelle, mit der es gelingt fremde DNA in das Plasmid einzuschleusen. Die Sequenzen der Fremd-DNA, welche z.B. die jeweiligen Untereinheiten der zu untersuchenden Rezeptoren kodieren, werden mittels Restriktionsenzymen, an bestimmten Stellen geschnitten, dann isoliert und vermehrt. Das Gleiche geschieht mit der Plasmid-DNA. Dadurch entstehen spezifische kohäsive Enden an der Fremd-DNA als auch an der Plasmid-DNA, die über eine Ligase verbunden werden. Das dabei entstehende rekombinierte DNA-Molekül wird wiederum in Bakterien eingeschleust. Antibiotikazusatz im Medium bedingt eine Selektion und Vermehrung nur von Bakterien, die Plasmide mit Antibiotikaresistenz-Gen besitzen. In der anschließenden Plasmidpräparation wird in mehreren Lysesritten, die Bakterienwand aufgebrochen, die Plasmide gereinigt, gewaschen und auf ihre DNA-Sequenzen kontrolliert. Zuletzt wird die Konzentration der Plasmide überprüft und schließlich in die Zellen transfiziert. Für die Transfektion stehen eine Reihe von unterschiedlichen Methoden zur Auswahl, die wegen der Vollständigkeit kurz vorgestellt werden sollen

Elektroporation:

Bei der Elektroporation werden die Zellen einem elektrischen Feld mit hoher Spannung ausgesetzt. Für wenige Sekunden wird die Zellmembran für die in der Lösung gehaltenen Plasmide, permeabel (Potter et al., 1993). Durch passive Diffusion gelangen die DNA-Moleküle in die Zelle. Wegen der raschen, einfachen Handhabung ist diese Methode in der Elektrophysiologie weit verbreitet. Zum anderen sind viele Zelltypen gegenüber anderen Techniken sehr instabil oder anschließend nicht mehr lebensfähig (Günzburg und Salmons, 1997).

Calciumphosphatpräzipitation:

Bei dieser Methode wird zunächst DNA gereinigt und mit Calciumchlorid in Gegenwart von Phosphatpuffer vermischt. Es bildet sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der auf die Zellen pipetiert wird. Der Niederschlag, bestehend aus kleinen Kristallen, wird über Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Ein Teil der DNA wird bis zum Kern transportiert, dort transkribiert und translatiert. Abhängig vom Zelltyp schwankt die Expressionsrate zwischen 5-30% (Chen und Okayama, 1988). Diese Methode ist von allen Transfektionsmethoden am weitesten verbreitet, weil sie ohne großen technischen Aufwand durchführbar und billig ist. Jedoch ist diese Methode sehr empfindlich bzgl. Abweichungen des pH-Wertes und Verunreinigungen der DNA. Sie ist für transiente als auch stabile Transfektion geeignet.

Lipofektion:

Ein Lipid oder Lipidgemisch wird in wässriger Lösung mit Ultraschall behandelt, sodass es zu Liposomenbildung kommt. Den dabei entstandenen Liposomen wird Zellkultur-Medium und DNA zugemischt. Die Mischung wird schließlich auf die zu transfizierenden Zellen pipetiert. Nachdem die Zellen ca. 1 h inkubiert wurden, sind ein Großteil der Liposomen-DNA-Komplexe mit der Zellmembran fusioniert und die DNA gelangt schließlich über das Zellinnere in den Zellkern. Das Expressions-Maximum wird zum Teil erst nach 48 h erreicht (Felgner, 1987). Die Methode ist noch teuer, jung und wenig ausgetestet, weshalb die Transfektionsraten auch erheblich schwanken (20 -95%). Die Empfindlichkeit gegenüber pH-Änderung ist gering und die Transfektionseffizienz scheint meist höher als die der Calciumphosphat-Methode zu sein.

Mikroinjektion:

Mit einer Pipette werden die zu transfizierenden Zellen aufgesaugt und diesen durch eine Kapillarnadel DNA-Lösung injiziert. Die jeweilige DNA-Menge ist gut kontrollierbar und die Effizienz dieser Methode sehr hoch, da die DNA gezielt in den Zellkern injiziert werden kann. Diese Methode spielt v.a. zur Herstellung von transgenen Tieren eine Rolle und erfordert einen hohen apparativen Aufwand sowie experimentelle Erfahrung und Geschicklichkeit (Mühlhardt, 2000).

Transfektion durch Beschuss:

Kleine Gold- oder Wolfram-Partikel werden mit DNA beschichtet und dann mit hoher Geschwindigkeit auf Zellen in Kultur oder Zellen am lebenden Tier geschossen (Yang et al., 1990). Die Methode wurde ursprünglich für Pflanzenzellen entwickelt, findet aber auch heute noch Anwendung bei Säugerzellen. Die Transfektionseffizienz ist häufig sehr gering (Johnston und Tang, 1994).

Außerdem gibt es noch virale Transfektionssysteme und die Transfektion mit Polykationen. Das Prinzip der zuletzt genannten Methode ist ähnlich dem der Calciumpräzipitation.

2.4. Die Patch-Clamp-Methode

2.4.1. Technische Grundlagen

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode, die ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren (Spannungsklemme) darstellt. Entwickelt wurde sie in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sackmann am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München. Die beiden Wissenschaftler erhielten 1991 für ihre Arbeit den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Der Name der Methode beschreibt diese selbst. Es werden letztendlich ein Membranstück (Flicken = Patch) oder eine ganze Zelle (Whole-Cell-Patch) auf eine feinst ausgezogene Glaspipette (Patch-Pipette) aufgenommen. Dabei wird folgendermaßen vorgegangen: Nach vorsichtigem Aufsetzen der Glaselektrode auf die Zellmembran wird zuerst Unterdruck erzeugt, so dass ein Teil der Zellmembran in die Pipettenöffnung gesaugt wird. Es entsteht ein elektrischer Abdichtwiderstand im $G\Omega$ -Bereich (sog. Giga-Seal) zwischen Glasmesselektrode und der umliegenden Zellmembran. Die mit der Pipette verbundene Verstärker-Apparatur registriert den Ionenfluss, der die membranständigen Ionenkanäle passiert (= transmembranäre Ströme). Im Prinzip wird der durch die Elektrode bedeckte Membranteil so gut isoliert, dass damit die Messung von Strömen im pA-Bereich ohne größere Rauschsignale möglich wird (Numberger und Draguhn, 1996). Mit diesem Verfahren ist erstmals möglich geworden elektrische Signale auf Membranebene zu erfassen. Somit eignet sich diese Methode sehr gut, um Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie von Spannungs- und Ligandenabhängigen Ionenkanälen detailliert zu untersuchen. Die dafür notwendige

Apparatur besteht aus einer Messelektrode und einer Referenzelektrode, die durch die Zellmembran getrennt sind. Die durch die zu untersuchenden Ionenkanäle fließenden Ströme verändern den transmembranären Widerstand und werden als Kompensationsströme durch den Patch-Clamp-Verstärker erfasst. Diese Kompensationsströme sind den Membranströmen der Zelle genau entgegengesetzt und werden mithilfe der Spannungsquelle erzeugt, um Membranpotentialänderungen zu vermeiden. Dabei wird zunächst das Membranpotential gemessen und mit der eingestellten Sollspannung verglichen. Bei Abweichung des Wertes wird ein Kompensationsstrom in die Zelle injiziert. Dieser Strom wird nun über den Verstärker registriert und zeigt somit Änderungen der Membranleitfähigkeit an und damit auch den Ionenfluss durch Kanäle (Numberger und Draguhn, 1996). Bei der Patch-Clamp-Technik kann man verschiedene Membrankonfigurationen unterscheiden, die u.a. je nach Fragestellung oder experimentellen Bedingungen unterschiedlich eingesetzt werden. So unterscheidet man die Whole-Cell-, die Outside-Out-, die Cell-Attached- und die Inside-Out-Konfiguration (Hamill et al., 1981). Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde nur der Whole-Cell-Modus verwendet. Eine schematische Darstellung zur Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration kann aus Abb. 2.4.1-1 entnommen werden. Bei der Whole-Cell-Konfiguration werden alle auf der Zelle ablaufenden elektrischen Vorgänge als Summationsströme gemessen. Dies wird durch den direkten Kontakt der Messelektrode mit dem Zellinneren ermöglicht. Die Zelle bleibt bei dieser Methode intakt, somit wird die Intrazellulärflüssigkeit nicht verändert und die Kanäle können weiterhin über zelleigene Enzyme und Second Messenger-Systemen reguliert werden.

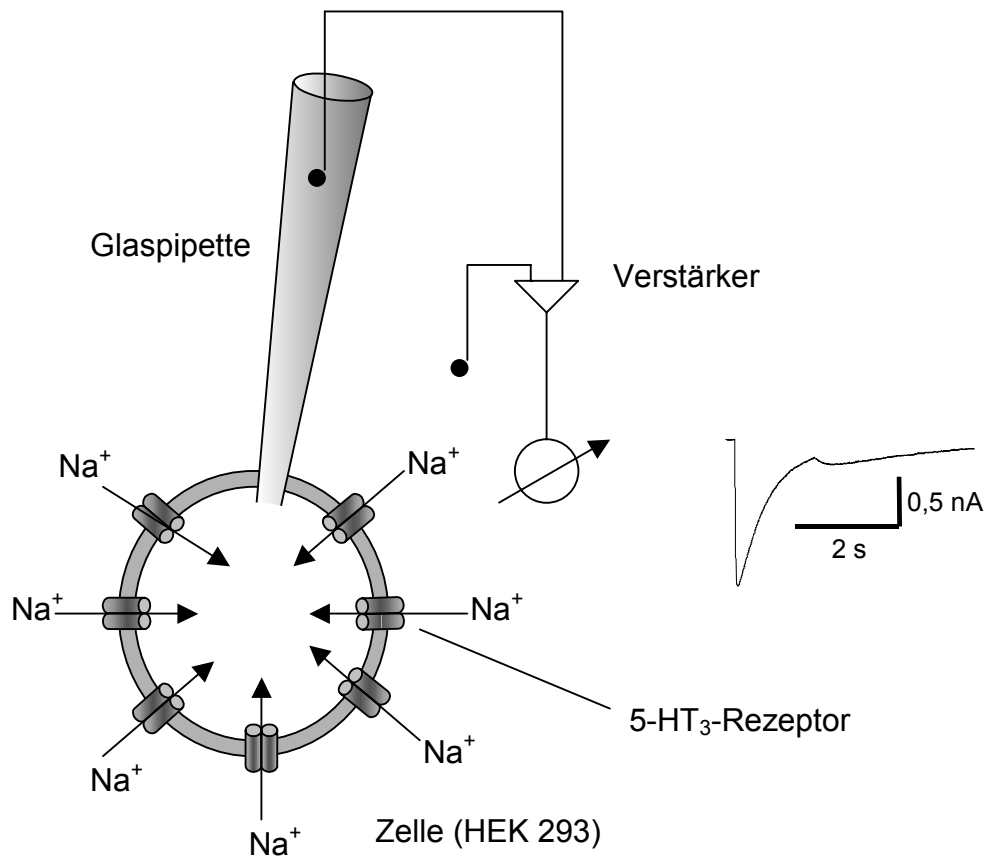


Abb. 2.4.1-1: Darstellung der Whole-Cell-Konfiguration. Hierbei besteht eine Verbindung zwischen Intrazellulärraum und dem Pipetteninneren. Es wird ein Summenstrom aus Einzelkanalströmen gemessen. (Abb. modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996)

2.4.2. Applikationsverfahren

Bei der Versuchsanordnung ist man bemüht die physiologischen Gegebenheiten nachzuahmen. Im Prinzip dient die an der Pipettenspitze hängende Zellmembran als Modell für die postsynaptische Membran bzw. für das postsynaptische Neuron. Die die Zelle umgebene Badlösung ist mit dem Milieu des synaptischen Spaltes vergleichbar. Damit man die Ionenströme der zu untersuchenden Ionenkanäle messen kann, müssen diese aktiviert werden. Dazu werden die Kanäle mit einer Agonistenlösung in Kontakt gebracht. Die Nachahmung der Transmitterfreisetzung im synaptischen Spalt birgt einige Schwierigkeiten, da zum einen der Transmitter-Gradient wie z.B. an GABAergen Synapsen in weniger als 1 ms

erzeugt werden (Jones und Westbrook, 1996) und zum anderen innerhalb von wenigen Millisekunden wieder abfallen soll (Clements, 1996), wie dies physiologischerweise entweder durch Abdiffusion oder präsynaptische Wiederaufnahme geschieht. Bisher wurden schon eine Reihe an Applikationsverfahren entwickelt, die hier nur wegen der Vollständigkeit kurz erwähnt werden sollen. Bei den ersten, langsamen Applikationsverfahren erfolgt der Lösungswechsel der gesamten Badlösung schwerkraftgetrieben innerhalb von Sekunden bis Minuten. Dies ist jedoch nicht ausreichend zur Bestimmung von Rezeptorkinetiken Liganden-gesteuerter Ionenkanäle, da hier die physiologischen Prozesse deutlich schneller ablaufen. Schnelle Applikationsverfahren hingegen ermöglichen mittlerweile den Lösungswechsel in kürzerer Zeit als die Zeitkonstante der schnellsten Änderung, die man messen will. Als schnelles Verfahren hat sich u.a. die U-Tube etabliert. Hierbei strömt die Agonistenlösung durch ein U-förmiges Glasrohr. Bei Schließen des eingebauten Ventils wird der Agonist für die Dauer des Ventilschlusses appliziert. Die Applikationszeit liegt bei ca. 100 ms. Ein weiteres schnelles Applikationssystem funktioniert über die Freisetzung von gekapselten Verbindungen, die zunächst in einer biologisch inaktivierten Form vorliegen und durch einen UV-Lichtblitz in die aktivierte zu applizierende Substanz überführt werden (Mc Gray und Trentham, 1989). Die Desapplikation des Transmitters erfolgt durch passive Abdiffusion.

Da gerade die Inaktivierungskinetik von Ionenkanälen aber entscheidend ist für den Zeitverlauf synaptischer Antworten, benötigt man zu deren Beurteilung ein System, das sowohl eine schnelle Applikation als auch Desapplikation ermöglicht. Ein speziell dafür entwickeltes piezotriebenes Applikationsverfahren wird diesen Anforderungen gerecht (Franke et al., 1987). Das in dieser Arbeit verwendete System ist ein piezogesteuertes Applikationssystem mit dem ein Lösungswechsel in weniger als 100 ms erreicht werden kann (nähere Erklärung siehe unter 4.2.3.).

2.5. Kinetische Modellierung Liganden-gesteuerter Ionenkanäle

Ein zentrales Thema bei der Untersuchung synaptischer Transmission ist die Beziehung zwischen synaptischer Transmitterfreisetzungsdauer und postsynaptischer Rezeptor-Aktivierung. Erste Untersuchungen an neuromuskulären Synapsen, bei denen die

Transmitterfreisetzung quantitativ bestimmt wurde gab es bereits in den 50er Jahren (Fatt und Katz, 1952). Weiterführende Arbeiten beschäftigten sich mit der Entwicklung von kinetischen Modellen unter Berücksichtigung spezieller kinetischer Eigenschaften (Colquhoun und Ogden, 1988; Liu und Dilger; 1991; Maconochie und Steinbach, 1998). Mit der Entwicklung kinetischer Modellierung erhofft man sich indirekt Hinweise auf die Regulation von Rezeptoren zu gewinnen. Zur Beschreibung funktioneller Übergänge eines Ionenkanals wie z.B. Aktivierung, Desensitisierung und Resensitisierung etc. erstellt man ein Reaktionsschema mit Übergangsraten (siehe Abb. 2.5-1). Das Reaktionsschema ist spezifisch für den jeweiligen Rezeptor und den verwendeten Agonisten. Die Anzahl an Bindungsschritten bis zur Öffnung des Kanals lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten ableiten. Die Kanalaktivierung kann man mit der “three state-kinetic theory” (del Castillo und Katz, 1957) beschreiben. Hierbei gehen die Rezeptor-Komplexe, ausgehend von einem ungebundenen Zustand (R), nach Bindung des Agonisten (A) in den gebundenen (noch geschlossenen) Zustand (RA), und danach erst in den offenen Zustand (O) über. Im offenen Zustand ist der Kanal schließlich für die kanalspezifischen Ionen passierbar. Der Übergang von R nach RA wird als “*binding*” bezeichnet und der Übergang von RA nach O als “*gating*”. Das vereinfacht dargestellte Reaktionsschema kann durch weitere mögliche Zustände (z.B. Blockierungsschritte, Desensitisierungsschritte etc.) ergänzt werden.

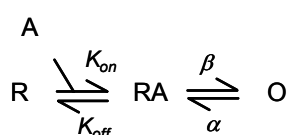
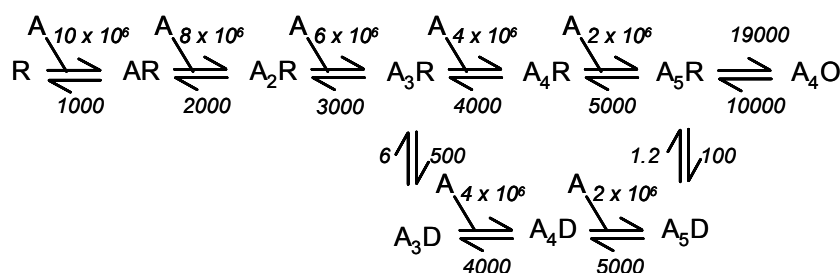


Abb. 2.5-1: Vereinfachtes Reaktionsschema für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Vom Ruhezustand (R) geht der Ionenkanal unter Bindung des Agonisten (A) in den gebundenen Zustand (RA) über. Unter Konformationsänderung kann dieser Zustand in den Offenzustand übergehen (O). Die Kinetik der Agonistenbindung wird durch die Assoziations- und- Dissoziationskonstanten K_{on} / K_{off} bestimmt. Die Öffnungskinetik des Kanals bestimmen die Raten α und β .

2.5.1. Beispiel 1: Die Desensitisierung eines Glutamat-Rezeptors

Glutamat bewirkt an Glu-Rezeptoren postsynaptisch eine erregende Antwort (Usherwood, 1994; Edmonds et al., 1995). Generell lassen sich Glu-Rezeptoren in zwei Hauptgruppen einteilen, den AMPA/KA- und den NMDA-Typ (Seeburg, 1993; Hollmann und Heinemann, 1994). In ihrer Kinetik weisen die beiden Typen Unterschiede auf (Colquhoun et al., 1992; Jonas und Spruston, 1994; Dudel et al., 1988). Das nun folgende Modell (konzipiert von Heckmann und Dudel) bezieht sich auf den Glu-Rezeptor im Muskel der Drosophila-Larve (Heckmann und Dudel, 1997), ein Rezeptor vom AMPA/KA-Typ (Schuster et al., 1991). Als Grundlage der Modellierung diente eine Reihe von Experimenten (Outside-Out-Patches) mit einem schnellen Applikationssystem.

Modell:



Erklärung zum Modell: (Die einzelnen Raten lassen sich aus dem Modell ablesen)

R (geschlossener Kanal)
 A (Agonistenmolekül)
 AR (Molekül gebunden am Rezeptor)
 AO (offener Kanal)
 AD (desensitisierte Kanal)

Abb. 2.5.1-1: Simulationsmodell von Heckmann/Dudel für den Glu-Rezeptor vom AMPA/KA-Typ.

Um den Ergebnissen der Experimente bzgl. der Offenwahrscheinlichkeit und der konzentrationsabhängigen Stromanstiegszeit gerecht zu werden, konzipierten die Autoren ein Modell mit 5 Bindungsschritten mit jeweils unterschiedlichen Offen- bzw. Geschlossen-Raten-Konstanten. Bei den Experimenten zeigte sich, dass die Desensitisierung deutlich konzentrationsabhängig ist. Dies wurde gelöst, indem bei dem Modell 2

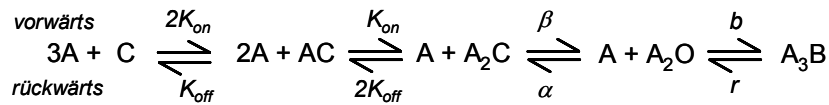
Desensitisierungswege mit unterschiedlichen Raten eingebaut wurden. Die 2 Desensitisierungswege gehen wiederum von 2 unterschiedlich starken Agonisten-besetzten Zuständen aus. Die Simulation der Erholungskinetik nach Desensitisierung des Rezeptors gelang durch die Verbindung zwischen den 2 Desensitisierungszuständen in Form eines Ringschlusses indem ein dritter Desensitisierungszustand AD_4 dazwischen geschaltet wurde.

2.5.2. Beispiel 2: Der spannungsabhängige Offenkanalblock eines Azetylcholin-Rezeptors

Von ACh in hohen Konzentrationen ist bekannt, dass es den ACh-Rezeptor blockiert (Sine und Steinbach, 1984; Liu und Dilger, 1991; Maconochie und Steinbach, 1998) und somit die Effektivität des Rezeptors deutlich reduziert. Dennoch ist bisher unklar, wie der ACh-Rezeptor auf eine kurzzeitig erhöhte Konzentration von ACh im synaptischen Spalt reagiert. Jones und Westbrook (1996) zeigten, dass die Desensitisierung des Rezeptors deutlichen Einfluss nimmt auf den postsynaptischen Zeitverlauf und andere Merkmale der postsynaptischen Antwort an zentralen Synapsen.

Legendre (Legendre et al., 2000) entwickelte unter Anlehnung an das Modell von Maconochie und Knight (1992), ein eigenes Simulationsmodell für den ACh-Rezeptor des Zebrafisches. Zur experimentellen Erfassung der kinetischen Eigenschaften verwendete er ein schnelles Applikationssystem in Kombination mit Outside-Out-Patches. Die gesammelten Daten bildeten die Grundlage für die Raten-Konstanten. Das Modell beschreibt einen spannungsabhängigen Offenkanalblock am ACh-Rezeptor des Zebrafisches.

Modell:



$$k_{on}: 1.6 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$$

$$k_{off}: 9 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$$

$$\alpha: 9.5 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$$

$$\beta: 3.5 \times 10^3 \text{sec}^{-1}$$

$$b: 7 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$$

$$r: 3.5 \times 10^3 \text{sec}^{-1} \text{ bei } -50 \text{mV}$$

AC (1 Bindungsstelle besetzt, Kanal geschlossen)

A₂C (zwei Bindungsstellen besetzt, Kanal geschlossen)

A₂O (geöffneter Kanal)

A₃B (Offen-Kanal-Block)

α (Geschlossen-Raten-Konstante)

β (Offen-Raten-Konstante)

b (diffusionsbegrenzte Raten-Konstante)

r (Erholungs-Raten-Konstante)

Abb-2.5.2-1: Reaktionsschema für einen ACh-Rezeptor.

Das Modell impliziert 2 Bindungsstellen mit den entsprechenden Vor- bzw. Rück-Raten. Der Wert von k_{off} steht in Abhängigkeit von k_{on} , damit das Wiedereröffnen des Kanals begrenzt wird. Dies lässt sich aus der schnellen Deaktivierung der Experimente ableiten. Die geschätzte Geschlossen-Raten-Konstante muss schneller sein als die Offen-Raten-Konstante, um eine schnelle Anstiegszeit und eine schnelle Abfallszeit zu erreichen.

3. Fragestellung und Zielsetzung

Als Teil des zentralen serotoninerger Nervensystems ist der 5-HT₃-Rezeptor von Bedeutung für die Pathophysiologie und die Therapie von Depressionen, sowie einiger Formen von Übelkeit und Erbrechen. Der 5-HT₃-Rezeptor hat darüber hinaus aber auch Einfluss auf andere Transmittersysteme, wie z.B. dem GABA-, dem ACh-, dem Dopamin-System etc. und kann deshalb in verschiedene Prozesse des ZNS eingreifen bzw. diese modellieren. Bisher sind die Regulationsmechanismen serotoninerger Synapsen unklar. Da direkte Messungen 5-HT₃-Rezeptor-vermittelter synaptischer Antworten schwer durch zu führen sind, verwendet man in der Regel indirekte Methoden zur Untersuchung dieses Transmittersystems. Als gängiges In-Vitro-Modell zur Untersuchung des 5-HT₃-Rezeptors haben sich HEK 293-Zellen etabliert, die klonierte humane 5-HT_{3A}-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dieses In-Vitro-Modell soll verwendet werden, um mittels Patch-Clamp-Technik in Whole-Cell-Konfiguration Agonist-induzierte Stromantworten abzuleiten. Die Stromantworten werden als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet und sollen Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Agonist und Rezeptor geben. Diese mögliche Interaktion soll außerdem noch als kinetisches Modell beschrieben werden.

Die gewonnenen Ergebnisse können vielleicht dazu beitragen die komplexen Mechanismen an serotoninerger Synapsen weiter aufzuklären.

4. Material und Methoden

4.1. Zellkultur und Rezeptorexpression

Für die Versuche verwendeten wir humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). Die Zellen wurden in einem Minimal-Essential-Medium (MEM) kultiviert, welches zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin versetzt wurde. Die genaue Rezeptur für MEM und FKS kann aus dem Anhang entnommen werden. Alle zwei Tage wurden die Zellen 1:2, max. 1:3 gesplittet und auf Petrischalen (100 x 20 mm) ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C in einem Inkubationsschrank (Haeraeus) mit 5% CO₂, 95% Luft-Gehalt und 100% relativer Luftfeuchtigkeit. Für das Zellpassagieren wurden PBS-Puffer (siehe Anhang), MEM und Trypsin ca. 10 min vor dem Splitten auf 37°C in einem Wasserbad vorgewärmt. Das Arbeiten mit der Zellkultur erfolgte unter der Steribank LaminAir^R HB2472 (Heraeus Instruments, D-München). Die Zelldichte wurde mit Hilfe eines Umkehrmikroskops von Olympus CK2-TR (Optical Co., LTD, Japan) kontrolliert und entsprechend dem Splittrhythmus und der Dauer der Trypsin-Einwirkung variiert. Zunächst wurde beim Splitten das alte Medium entfernt, dann die adhärennten Zellen mit 3 ml PBS-Puffer gewaschen und der Puffer wiederum entfernt. Anschließend behandelten wir die Zellen mit 2 ml 1:5 Trypsin-Lösung, damit sie von dem Boden der Petrischalen gelöst werden konnten. Die Wirkung des Trypsin wurde nach ca. 1-2 min durch die Zugabe von 3 ml MEM gestoppt. Weiteres Lösen der Zellen von der Oberfläche gelang mit Hilfe eines Hirschmann Pipetus. Wir füllten dann die Zellsuspension in einen 50 ml Falcon-Tube und gaben diesen in die Zentrifuge (250 U/min, 4 min). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet mit dem entsprechendem Volumen an MEM (10 ml) aufgenommen und unter Halbierung der Zellkonzentration erneut ausgesät.

Die Rezeptorexpression des 5-HT_{3A}-Rezeptors wurde durch stabile Transfektion erreicht. Dazu wurde cDNA, die die humane 5-HT_{3A}-Untereinheit (Nukleotide 217-1663; Genbank-Zugriffsnummer: D449394) kodiert in den pCDM8-Plasmidvektor kloniert (Davies et al., 1999).

4.2. Elektrophysiologie

Die folgenden Experimente werden bei Raumtemperatur (20-23°C) durchgeführt. Gemessen wurden Agonist-induzierte Einwärtströme in der Whole-Cell-Konfiguration. Für die Experimente wurde das Medium (MEM) von den Zellen entfernt und durch Extrazellulärlösung (siehe Anhang) ersetzt.

4.2.1. Messelektroden

Mit einem Elektroziehgerät, das im Zweizugverfahren arbeitet, werden die Messelektroden hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienen Glaspipetten-Rohlinge aus Borosilkat (Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm). Bei dem Verfahren werden die Pipetten zuerst vorgezogen d.h. unter starkem Erhitzen mittels einer Glühwendel mittig um ca. 1 cm ausgezogen, so dass sie sich auf etwa 0,2 bis 0,4 mm verjüngen. Im nächsten Schritt kommt es wiederum unter starker Hitze-Einwirkung zum weiterem Auseinanderziehen, wobei die Pipette nun an ihrer dünnsten Stelle reißt. Somit erhält man zwei Pipetten, die jeweils mit Intrazellulärlösung (siehe Anhang) gefüllt werden und einen seriellen Widerstand zwischen 4-9 M Ω aufweisen.

4.2.2. Die Whole-Cell-Konfiguration

Bei dieser Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (siehe Einleitung 2.4.) wird unter Mikroskopsicht die Pipettenspitze vorsichtig an eine am Schälchenboden liegende adhärente Zelle herangeführt. Beim Aufsetzen der Pipettenspitze auf die Zellemembran verringert sich der serielle Widerstand. Dies erkennt man daran, dass die Stromantwort auf einen über der Pipettenöffnung angelegten Spannungspuls kleiner wird. Über die Pipettenhalterung ist es möglich auf das Pipetteninnere Unterdruck zu erzeugen, sodass die Zellmembran etwas in die Pipettenspitze eingezogen wird und eine sog. Cell-Attached-Konfiguration entsteht. Der Verstärker signalisiert nun durch die sinkende Stromamplitude einen hohen Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran. Bei wiederholten Anlegen eines etwas stärkeren Soges, kann nun die Zellmembran durchbrochen (perforiert) werden und es entsteht eine Whole-Cell-Konfiguration. Zur Überprüfung der Whole-Cell-Konfiguration wird das Augenmerk auf die Entstehung von kapazitiven Artefakten (Lade- und Entladeströme der nun als Kondensator wirkenden Zellmembran) sowie einem

persistierenden hohen Abdichtwiderstand gelegt. Liegt dieser Abdichtwiderstand im GΩ-Bereich, so spricht man von einem Giga-Seal.

Mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers (Axopatch 200B) wird nun eine Clamp-Spannung von ca. -40 mV angelegt. Dadurch können die Agonist-induzierten 5-HT₃-Rezeptor-Antworten als Einwärtsstrom aufgezeichnet werden. Durch die Ionen-Zusammensetzung der verwendeten Intra- und Extrazellulärlösung bestehen die Rezeptor-Antworten aus einem reinem Na⁺-Fluss. Über einen Analog-Digitalwandler werden die Ströme mit einer Rate von 20 kHz digitalisiert und einer Tiefenpassfilterung (2 kHz) unterzogen.

4.2.3. Applikationsverfahren

Wie schon unter 2.4.1. beschrieben, wählten wir ein schnelles Applikationssystem. Bei dem verwendeten Applikationssystem ist ein Polyethylenröhrchen an einem Piezokristall befestigt, durch das die Testlösung (Hintergrundlösung) schwerkraftgetrieben fließt. Innerhalb des Röhrchens ist eine Glaskapillare befestigt, durch die, in gleicher Richtung, druckgetrieben die Agonistenlösung fließt. Beide Lösungen bilden bei laminaren Strömungsverhältnissen ein sog. Flüssigkeitsfilament mit exakter Grenze (siehe Abb. 4.2.3-1). Die Grenze wird sichtbar gemacht, indem die Agonistenlösung mit dem Farbstoff Lissamingrün angefärbt wird. Genau an dieser Stelle wird der Patch unter Binokularsicht platziert. Durch einen Spannungsimpuls wird der Piezokristall aktiviert, das Flüssigkeitsfilament bewegt sich um 20 µm auf die Zelle zu und die durch die Testlösung präinkubierte Zelle wird vollständig in die Agonistenlösung eingetaucht (Applikation). Während der Applikationszeit von 1,5 s werden die Ionenkanäle bei Kontakt mit der Agonistenlösung aktiviert und es fließt Strom. Am Ende des Spannungsimpulses wird das Flüssigkeitsfilament wieder von der Zelle wegbewegt und die Zelle wird wieder von Testlösung umgeben (Desapplikation). Zwischen den Einzelimpulsen werden Pausen von 30 s eingelegt, damit eine vollständige Resensitisierung der 5-HT₃-Rezeptoren möglich ist. Dieses Applikationssystem erlaubt eine schnelle Applikation von unter 100 µs. Die Abb. 4.2.3-2 stellt den eben beschriebenen Ablauf nochmals schematisch dar.

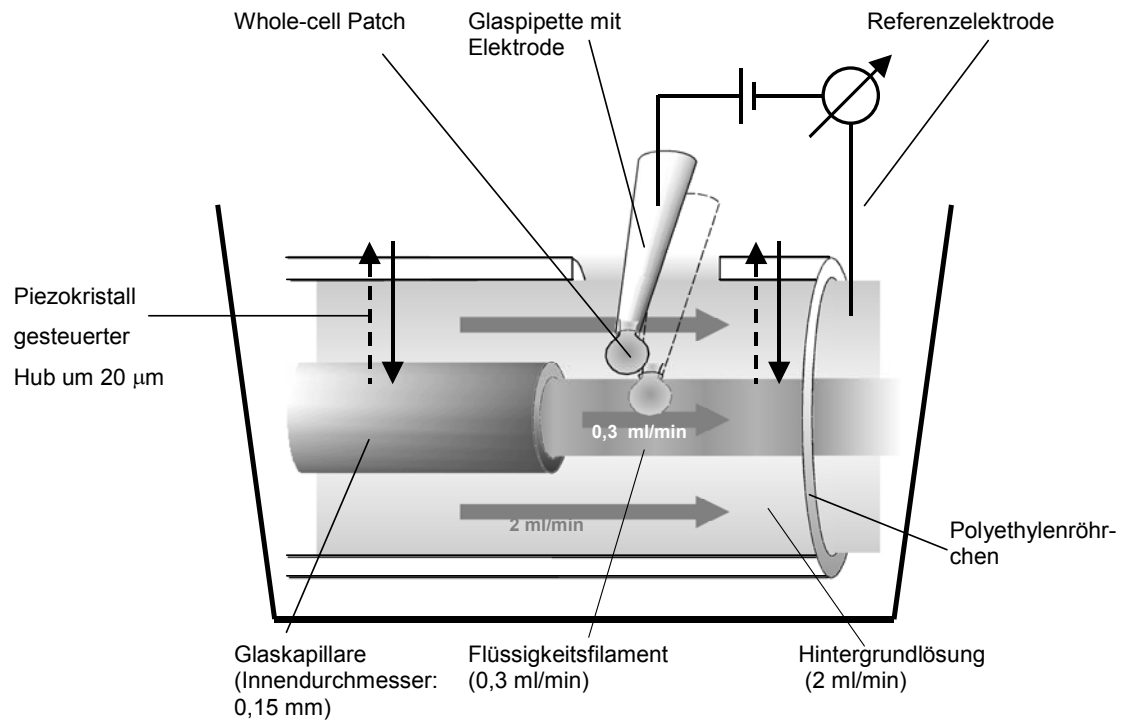


Abb. 4.2.3-1: Schematische Darstellung eines piezobetriebenen Applikationssystems. Hierbei werden Austauschzeiten der die Zelle umgebenden Flüssigkeit in $< 100 \mu\text{s}$ erreicht.

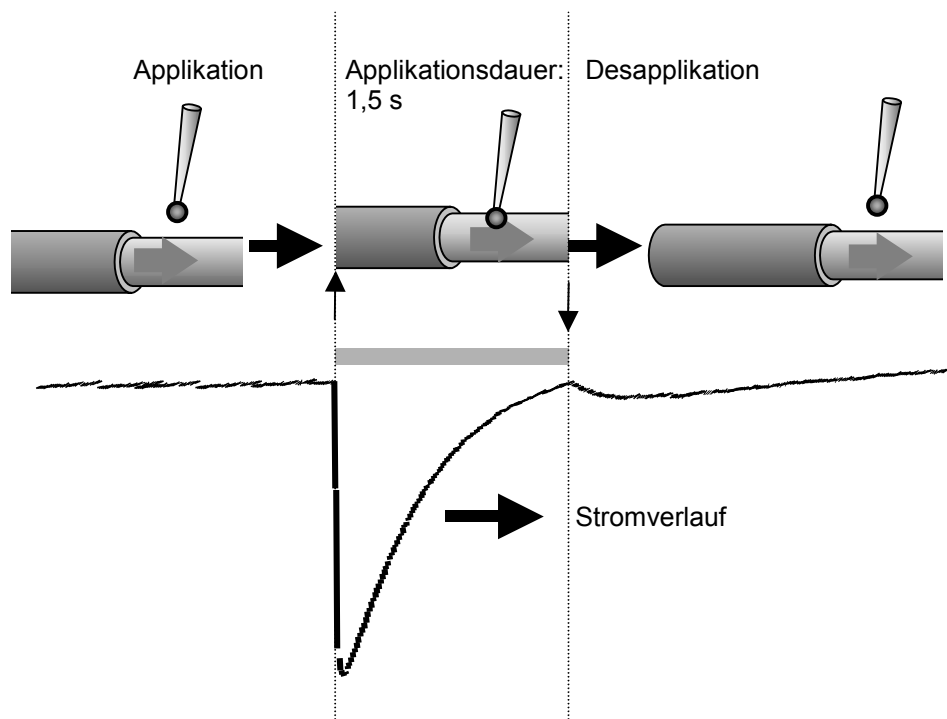


Abb. 4.2.3-2: Schematische Darstellung von Applikation und Desapplikation des Agonisten Serotonin mit resultierender Stromantwort am 5-HT_{3A}-Rezeptor.

4.2.4. Verwendete Lösungen

Serotoninlösung (5-Hydroxytryptamin-Hydrochlorid; 5-HT):

Aus 5-Hydroxytryptamin in Pulverform (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Germany) mit einem Molekulargewicht von 212,7 g/mol wird eine Stammlösung (10^{-1} M) mit destilliertem H_2O hergestellt, die eingefroren wird. Bei Bedarf wird diese aufgetaut und die benötigte Konzentration in einer Verdünnungsreihe mit Extrazellulärflüssigkeit hergestellt. Für alle Versuche wird diese Agonistenlösung bzw. Vordergrundlösung mit Lissamingrün angefärbt, um den Patch richtig platzieren zu können.

Methylcyclophenylbiguanidlösung (mCPBG):

Der potente 5-HT₃-Rezeptor-Agonist mCPBG (Tocris, Bristol, UK) mit einem Molekulargewicht von 248,11 g/mol liegt in Pulverform vor. Die benötigte Konzentration wird analog zu 5-HT hergestellt.

Y-25130 ([N-(4-azabicyclo [2.2.2.]oct-3-yl)-6-chloro-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzo-xanazine-8-carboxamide hydrochloride]):

Der potente und selektive 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Y-25130 (Tocris, Bristol, UK) wurde ebenfalls analog zu der 5-HT-Lösung hergestellt.

Intrazellulärlösung:

Als Intrazellulärlösung wird die in der Messpipette enthaltene Lösung bezeichnet. Sie ist der physiologischen Intrazellulärflüssigkeit nachempfunden. Im Whole-Cell-Modus besitzt das Pipetteninnere Anschluss an den Intrazellulärraum der HEK-Zellen (Zusammensetzung siehe Anhang).

Extrazellulärlösung:

Unter der Extrazellulärflüssigkeit versteht man die Flüssigkeit, die in der Messkammer die Agonistenlösung umgibt. Die Zusammensetzung, der pH und die Osmolarität wurden der physiologischen Extrazellulärflüssigkeit (genaue Zusammensetzung siehe Anhang) nachempfunden. Ein Unterschied zur physiologischen Extrazellulärflüssigkeit besteht jedoch bzgl. der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration. Die hier bei den Experimenten verwendete Extrazellulärflüssigkeit ist Ca^{2+} -Ionen-frei, da Ca^{2+} -Ionen die Stromamplituden der 5-HT₃-

Rezeptor-induzierten Ströme vermindern und Einfluss auf die Desensibilisierung haben (Brown et al., 1998; Mariq et al., 1991; Yakel, 1993).

4.2.5. Aufnahmesystem, Messgrößen und Auswertung

Die 5-HT-induzierten Ströme werden mittels pClamp 6.0 Software über einen Rechner gesteuerten Axopatch 200B-Patch-Clamp-Vertärker bei einer Digitalisierungsrate von 20 kHz und einem Tiefpassfilter von 2 kHz registriert. Die Daten werden auf der Festplatte gespeichert und später mit der AxoGraph 3 (für MacOS) Software ausgewertet. Die gemessenen Stromantworten werden als Strom-Zeit-Diagramme aufgetragen. Bei ihrer Analyse können mehrere Parameter unterschieden und bestimmt werden. Es werden der Maximalstrom (meist in pA oder als Relativwert innerhalb einer Messreihe in % angeben) und Stromanstiegszeit (10-90% rise time) automatisch registriert. Die Rezeptordesensibilisierung wird als exponentieller Stromabfall bei weiterhin bestehender Agonistenpräsenz gemessen. Somit kann man die Desensibilisierung mittels exponentiellen Fittings (AxoGraph-Software) nach folgender Formel mathematisch beschreiben:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_0) + I_s \quad (\text{monoexponentiell})$$

I_0 : Komponente des Stromabfalls

τ_0 : Zeitkonstante

I_s : Steady-State-Strom

Die Desensibilisierungsphase des 5-HT_{3A}-Rezeptors setzt sich typischerweise aus einer langsamen und einer schnellen Komponente zusammen. Aus diesem Grund wird sie mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben:

$$I(t) = I_{\text{fast}} \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + I_{\text{slow}} \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + I_s \quad (\text{biexponentiell})$$

I_{fast} und I_{slow} : Anteile der schnellen und langsamen Komponente

τ_{fast} und τ_{slow} : die schnelle und langsame Zeitkonstante

EC₅₀ und der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe von SigmaPlot 5.00 errechnet. Die Stromantwortkurven der unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen wurden mit SigmaPlot 5.00, SPSS Inc. mit folgender Gleichung gefittet:

$$I/I_{\max} = A^{nH} / (A^{nH} + EC_{50}^{nH})$$

I: maximale Stromamplitude unter der Konzentration A (des Agonisten)

I_{max}: maximale Stromamplitude.

EC₅₀ Agonistenkonzentration bei halbmaximaler Stromamplitude.

nH: Hill-Koeffizienten.

Das Datenmaterial ist als Mittelwert mit der Standardabweichung und der Anzahl der Experimente angegeben.

4.2.6. Computersimulationsprogramm

Wir verwendeten für die Simulation der Rezeptor-vermittelten Ströme ein speziell dafür ausgerichtetes Computerprogramm (BIOQ-Biochemical Equations Software). Dieses war lebenswürdigerweise über Frau Prof. Hanna Parnas erhältlich (Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel). Die Software zur Bearbeitung bestimmter Differentialgleichungen ist ein Windows kompatibles Update und basiert auf einem UNIX kompatiblen Programm zur analytischen Beschreibung von synaptischen Strömen (Parnas et al., 1989). Es ist als Download auf der Internetseite: <http://www.ls.huji.ac.il/~parnas/Program/homepage.html> erhältlich. Mittels dieser Software ist es möglich ein kinetisches Reaktionsschema für einen Ionenkanal aufzustellen und Raten-Konstanten für Hin- und Rückreaktionen einzusetzen. Die einzelnen Zustände (offen – geschlossen etc.) werden auf ihre Wahrscheinlichkeit hin berechnet und dargestellt. Das entworfene Reaktionsschema kann schließlich als kinetisches Modell gelten, wenn es in Verbindung mit den passenden Raten eine gute Übereinstimmung zwischen den simulierten und den gemessenen Daten gibt. Die Schemata basieren auf einem 3-Phasen-Modell, dessen theoretische Ansätze von del Castillo und Katz (1957) stammen.

Die Entwicklung eines kinetischen Modells hat zum Ziel das durch die Experimente gewonnene wie auch simulierte Datenmaterial unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen darstellen zu können und interpretieren zu helfen.

5. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit den kinetischen Eigenschaften des 5-HT_{3A}-Rezeptors, insbesondere den Desensitisierungsmechanismen beschäftigt. Wir führten dazu Patch-Clamp-Experimente im Whole-Cell-Modus durch. Die verwendeten klonierten 5-HT_{3A}-Rezeptoren wurden heterolog in HEK 293-Zellen exprimiert. Die Versuchsreihen wurden alle in Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Extrazellulärlösung durchgeführt, um eine Reduzierung der Stromantwort und gleichzeitig eine Verstärkung der Rezeptor-Desensitisierung durch extrazelluläres Ca²⁺ und Mg²⁺ (Yakel et al., 1993, Yakel, 1996; Gunthorpe et al., 2000; Lobitz et al., 2001) zu vermeiden. Die gleichen experimentellen Bedingungen haben wir in unserer Arbeitsgruppe bereits bei vorhergehenden Experimenten verwendet. Die elektrophysiologisch gewonnenen Daten dienten uns schließlich als Grundlage für die kinetische Modellierung.

5.1. Die Serotonin-Dosis-Wirkungskurve am humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor

Zur Charakterisierung der Aktivierungs-Kinetik des homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors haben wir eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der applizierten 5-HT-Konzentration und der Rezeptor-Antwort aufgestellt (siehe Abb. 5.1-1). Dazu wurde der Agonist in stufenweise ansteigender Konzentration bei einem konstanten Haltepotential von -30 mV appliziert. Die Applikationszeit betrug 1,5 s. Zwischen den Applikationen lag ein Zeitintervall von 30 s zur vollständigen Resensitisierung der Rezeptorkanäle. Mithilfe der Dosis-Wirkungsbeziehung konnten wir den Einfluss der Agonistenkonzentration auf Stromamplitude, Anstiegszeit, Desensitisierungszeit und Nachstrom erfassen. Der sog. Nachstrom zeigte sich typischerweise bei Beendigung der Transmitterapplikation.

Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungsbeziehung für die Stromamplitude ergab sich eine EC₅₀: 3±0,6 µM und ein Hillkoeffizient von 1,8±0,3. Diese Daten finden Übereinstimmung mit der Literatur (Davies et al., 1999). Die Dosis-Wirkungsbeziehung ist typischerweise sigmoid.

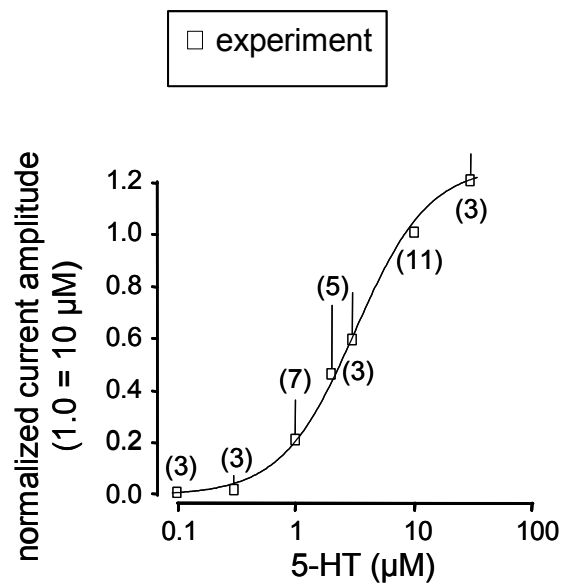


Abb. 5.1-1: Dosis-Wirkungs-Kurve der 5-HT-induzierten Stromantworten, Hill-Koeffizient: $1,8 \pm 0,3$; EC_{50} : $3 \pm 0,6$ μM .

Die Stromanstiegszeit hing von der applizierten Agonistenkonzentration (0,1-30 μM) ab (siehe Abb. 5.1-2 und Abb. 5.1-3) und betrug 500 ms bis 50 ms, d. h. je höher die applizierte Agonistenkonzentration, desto kürzer war die Anstiegszeit zum Erreichen der maximalen Stromantwort. Die Desensibilisierung zeigte typischerweise einen biphasischen Zeit-Verlauf, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. Der Anstieg der Nachströme ist steil, ihre Deaktivierung ist sehr langsam (siehe Abb. 5.1-2).

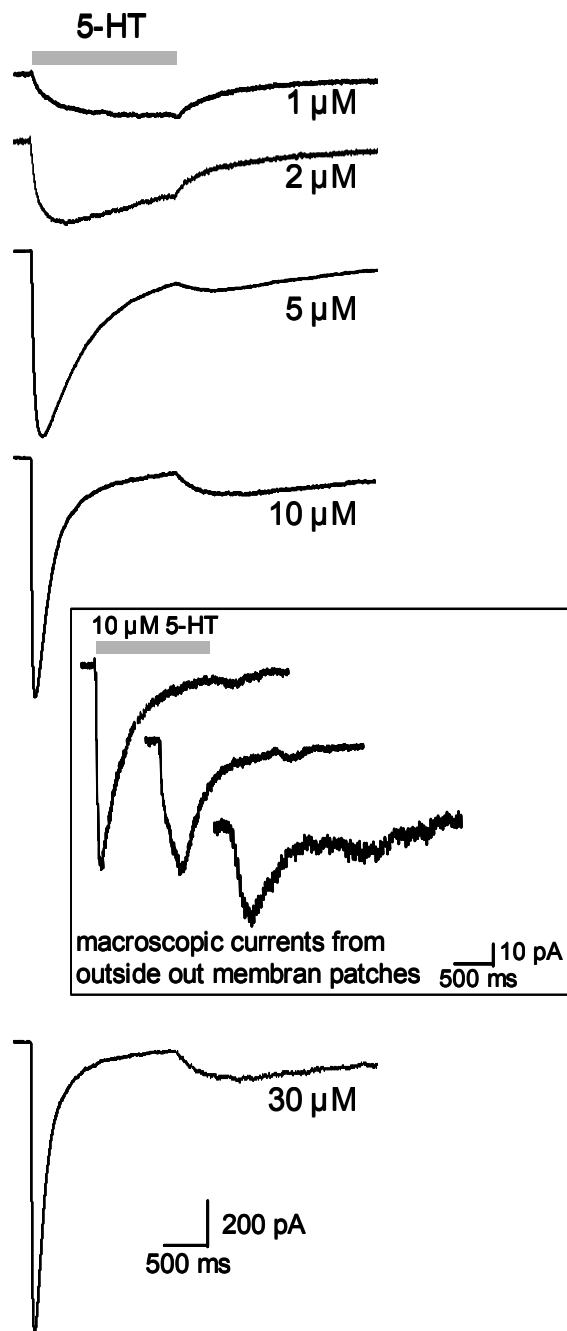


Abb. 5.1-2: 5-HT-induzierte Ströme bei steigenden 5-HT-Konzentrationen.

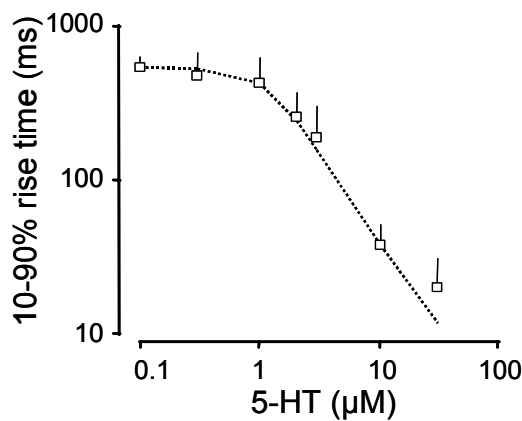


Abb. 5.1-3: Stromanstiegszeiten der 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Ströme bei steigenden 5-HT-Konzentration

5.2. Die Erholungskinetik nach Desensitisierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors

Mithilfe von repetitiven Serotonin-Pulsen (10 μM) untersuchten wir den zeitlichen Verlauf des Übergangs vom desensensitisierten in den re-sensitisierten Zustand des Rezeptors. Hierzu wurden zwei aufeinanderfolgende Serotonin-Pulse mit verschiedenen Zeit-Interwallen (2,5 s; 5 s; 10 s; 20 s) appliziert (siehe Abb. 5.2-1). Die Erholung der Stromantwort auf >50% erforderte 7 s, die Erholung auf >95% dauerte 25 s (siehe Abb. 5.2-2). Fällt die Serotonin-Applikation zeitlich direkt in den Nachstrom, der den Ionenstrom durch bereits wieder geöffnete Ionenkanäle widerspiegelt, so verläuft der Stromabfall des Nachstroms ähnlich wie der des initialen Stroms (siehe Abb. 5.2-1). Dieses Phänomen konnte bereits vor Abschluss der Experimente durch die Simulationen gezeigt werden (siehe unter 5.4.6) und lässt sich durch einen Serotonin-induzierten Kanalblock gut erklären. Mit anderen kinetischen Modellen (ohne Agonist-induzierten Kanalblock) konnten diese Stromverläufe nicht simuliert werden.

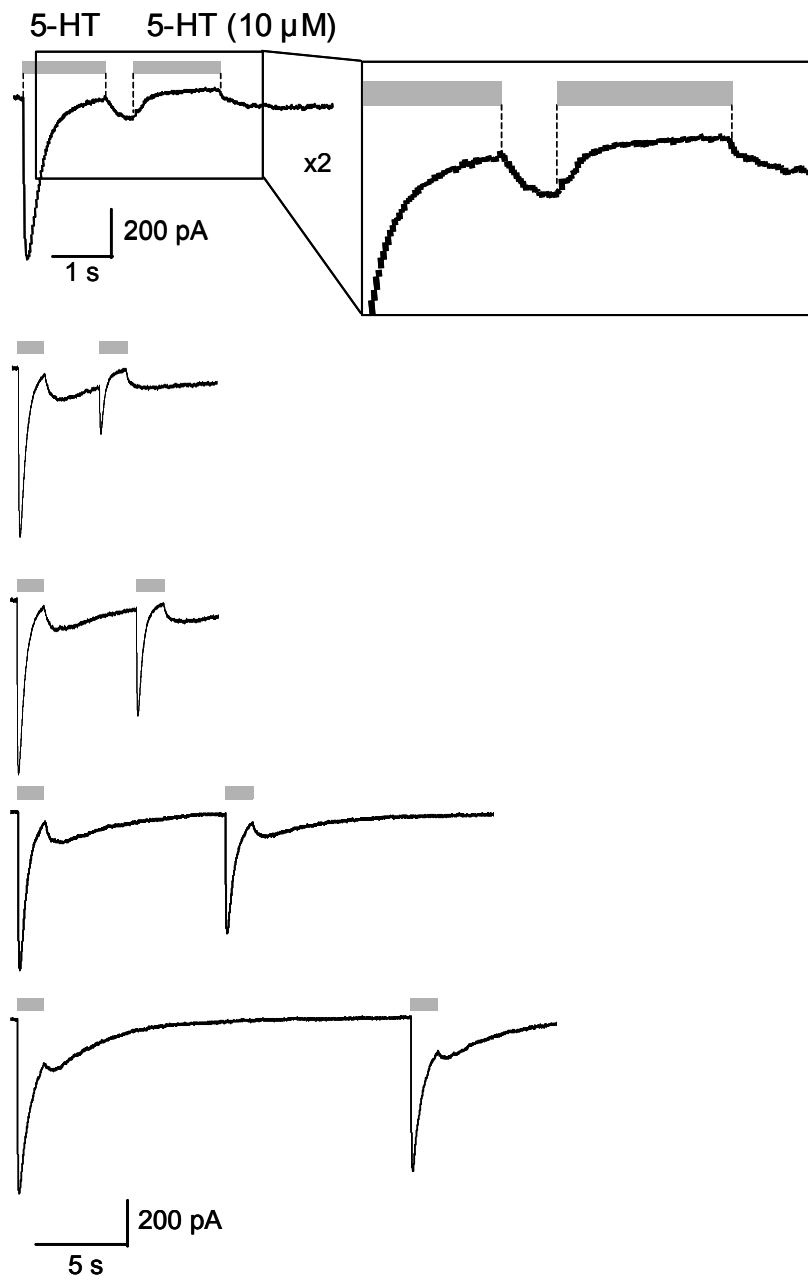


Abb. 5.2-1: Repetitive Serotonin-Pulse mit unterschiedlichen Zeitintervallen.

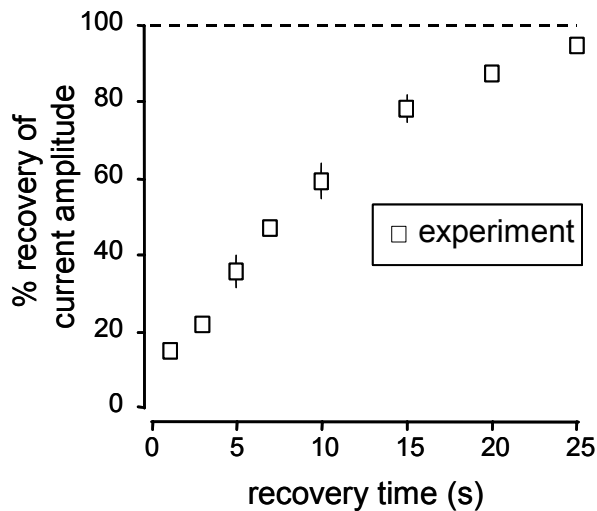


Abb. 5.2-2: Erholungskinetik nach Desensitisierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors.

5.3. Die schnelle Agonistenapplikation

Bislang besteht immer noch Unklarheit über den physiologischen Hergang an Synapse mit 5-HT_{3A}-Rezeptoren hinsichtlich der wirksamen Serotonin-Konzentration im synaptischen Spalt und ihrer Wirkungsdauer. Es wird vermutet, dass für die Rezeptoraktivierung nur eine kurze Exposition mit dem Liganden notwendig ist. Um dem gerecht zu werden, verwendeten wir bei der Durchführung des folgenden Experiments kurze Applikationszeiten. Wir reduzierten die Applikationszeit von Serotonin (10 μ M) stufenweise von 2,5 s auf 20 ms mit Hilfe des “Fast-Switch“-System (siehe 4.2.3).

Bei dem Experiment zeigte sich, dass mit zunehmend kürzerer Applikationszeit die Ausbildung eines Nachstroms reduziert, bzw. letztendlich aufgehoben werden kann. Gleichzeitig stellte sich die Deaktivierungszeit mit abnehmender Applikationsdauer kürzer dar. Die Deaktivierungszeit verringerte sich bei einer Applikationszeit von 2,5 s mit 6505 ms auf 128 ms bei einer Applikationszeit von 20 ms (siehe Abb.5.3-1). Bei einer Applikationszeit unter 50 ms weist die Stromspur keinen Nachstrom mehr auf. Unter diesen Bedingungen kommt der Abfall des Ionenflusses vermutlich durch Rezeptordeaktivierung zustande bevor Serotonin den offenen Kanal überhaupt blocken konnte. Weiterhin fiel auf, dass sich bei einer Applikationszeit unter 20 ms die initial maximale Stromantwort nicht einstellt, da hier die

Applikationszeit kürzer ist, als die benötigte Zeit zum Erreichen der Maximalstromantwort (10-90% rise time: 38 ± 13 ms mit $10 \mu\text{M}$ 5-HT).

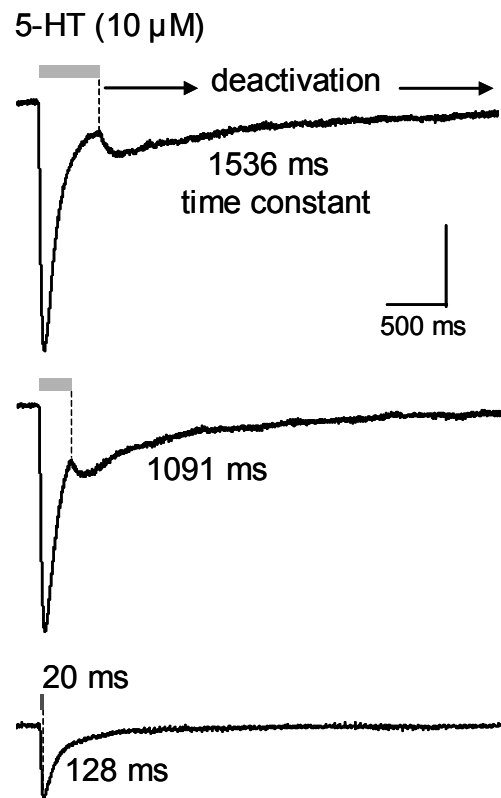


Abb. 5.3-1: Einfluss der Agonistenapplikationsdauer auf die Stromantwort des 5-HT_{3A}-Rezeptors. Mit zunehmend kürzerer Applikationszeit wird der Nachstrom reduziert und die Deaktivierungszeit verkürzt. Außerdem stellt sich bei einer Applikationszeit < 20 ms die maximale Stromantwort nicht ein.

5.4. Die Spannungsabhängigkeit bei Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors

Der 5-HT_{3A}-Rezeptor zeigte bei schrittweise steigenden Spannungspotentialen (von -90 bis $+70$ mV) eine leichte Einwärts-Gleichrichtung (siehe Abb. 5.4-1). Beim Vergleich der verschiedenen Strom-Spannungskurven lässt sich kein Einfluss auf die Kinetiken der 5-HT-induzierten Ströme erkennen. Die Spannungsunabhängigkeit des Vorhandenseins der

Nachströme zeigt, dass der Serotonin-induzierte Offen-Kanal-Block am humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor somit spannungsunabhängig ist.

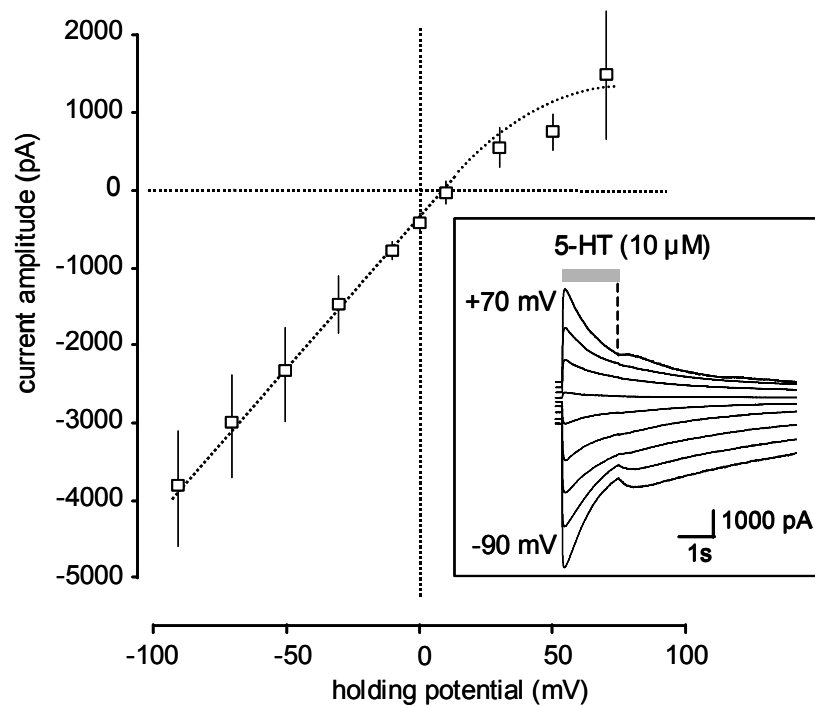


Abb. 5.4-1: Strom-Spannungsbeziehung bei Rezeptoraktivierung durch 5-HT.

Im Anschluss an die im Experiment untersuchte Strom-Spannungsreihe wurde in verschiedenen Konzentrationen der selektive 5-HT_{3A}-Rezeptor-Blocker Y25130 (10 nM) appliziert. Y25130 (10 nM) reduzierte die Stromantwort auf 30% der initialen Stromantwort (siehe Abb. 5.4-2). Ein vollständiger Block wurde bei einer Konzentration von 300 nM erreicht (hier nicht gezeigt).

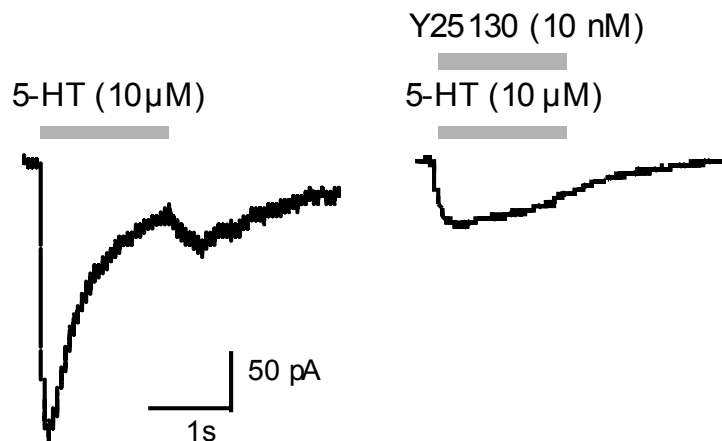


Abb. 5.4-2: Der selektive 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Y25130 (10 nM).

5.5. Die Aktivierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors durch mCPBG

Bei den bisherigen Protokollen wurde Serotonin als Agonist verwendet. Zum Ausschluss Serotonin-spezifischer Effekte wurde bei dem nun folgenden Versuchsprotokoll Serotonin durch den spezifischen 5-HT₃-Agonisten mCPBG ersetzt. Wir erstellten erneut eine Dosis-Wirkungskurve (0,3-30 μM) (siehe Abb. 5.5-1). Die gegeneinander aufgetragenen Daten aus Strom-Amplitude und Agonistenkonzentration ergaben einen glockenförmigen Verlauf. Wie bei den vorausgegangenen Versuchen wurden nach schnellem Entfernen des Agonisten (mCPBG > 3 μM) vom Rezeptor Nachströme beobachtet (siehe Abb. 5.5-2), sogar noch deutlicher als unter Verwendung von Serotonin. Weiterhin wurde die Resensibilisierungszeit analog dem Versuchsprotokoll mit Serotonin untersucht. Repetitive mCPBG-Pulse (10 μM) wurden in verschiedenen Zeit-Interwallen (0,5 s; 1,5 s; 6 s; 20 s, 50 s) appliziert (siehe Abb. 5.5-3). Für die Erholung der Stromantwort auf >50% wurden 20 s benötigt, die Erholung auf über 95% erforderte 50 s (siehe Abb. 5.5-4). Hier zeigte sich also eine deutlich langsamere Resensibilisierung als unter Serotonin.

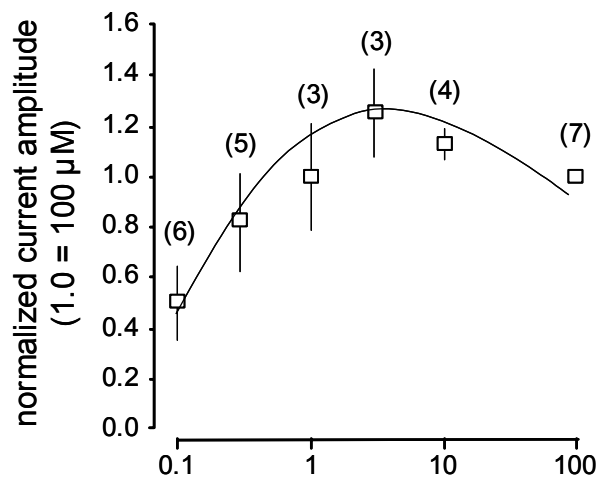


Abb. 5.5-1: Dosis-Wirkungskurve mit mCPBG.

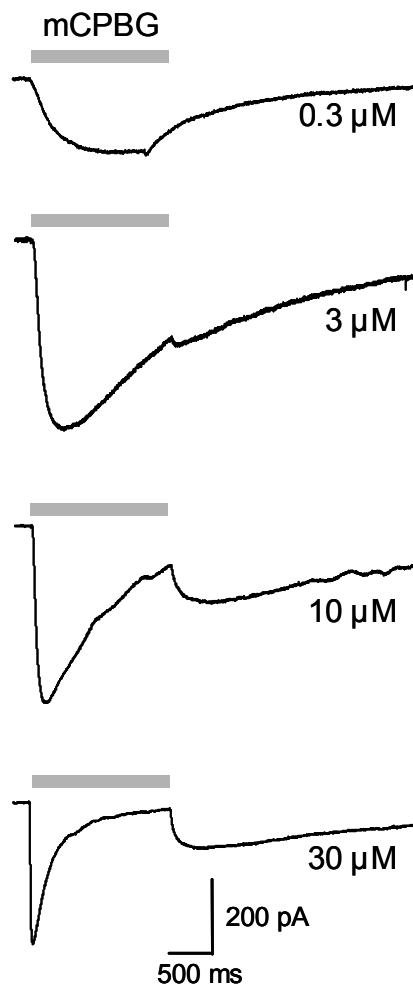


Abb. 5.5-2: Stromspuren mit mCPBG unterschiedlicher Konzentrationen.

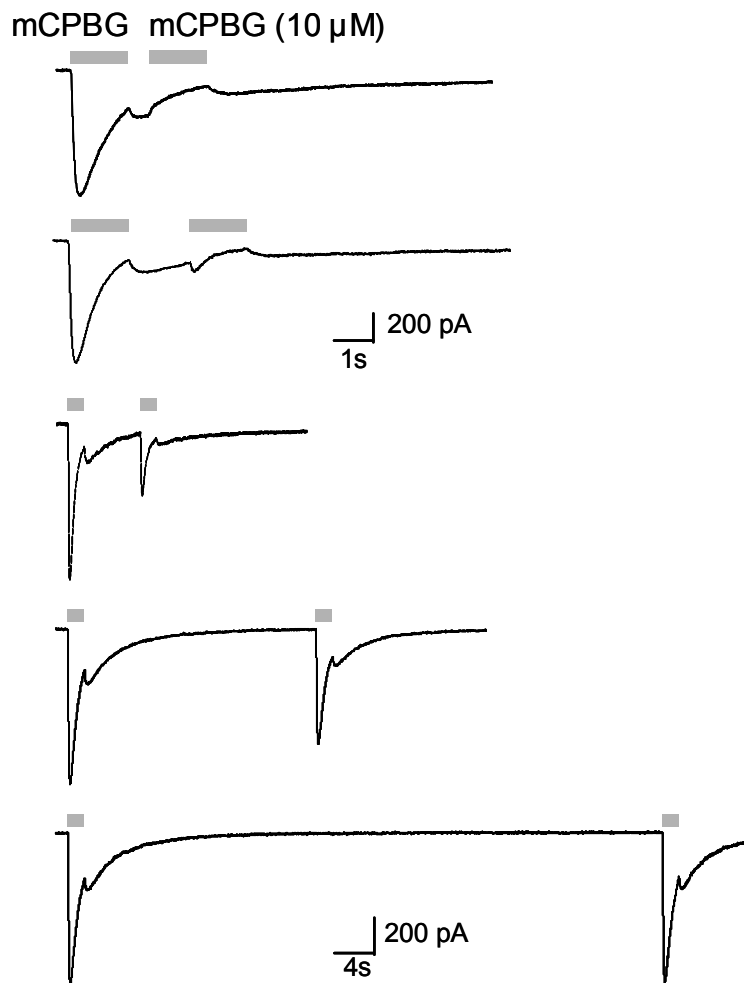


Abb. 5.5-3: mCPBG-induzierte Ströme unter repetitiven Pulsen mit unterschiedlichen Zeitintervallen.

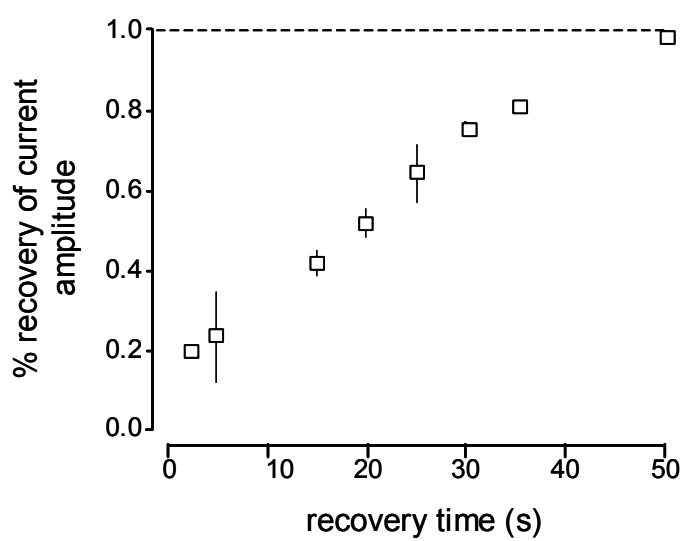


Abb. 5.5-4: Erholungskinetik unter mCPBG.

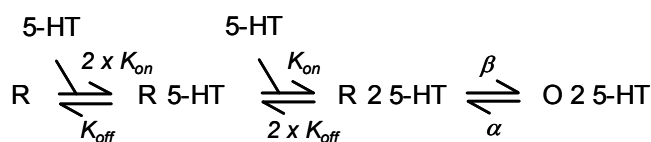
5.6. Die Entwicklungsschritte zum Simulationsmodell

Anhand der experimentellen Daten versuchten wir mit Hilfe von BIOQ-Biochemical-Equation-Software die Stromspuren des 5-HT_{3A}-Rezeptors im Hinblick auf seine kinetischen Eigenschaften zu simulieren und entwickelten daraufhin ein kinetisches Rezeptor-Modell. Die folgende Beschreibung dokumentiert die Entwicklungsschritte, die dabei durchlaufen wurden.

5.6.1. Das Simulationsmodell ohne Block

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, bewirkt die Bindung eines Liganden an einem Liganden-gesteuerten Ionenkanal die Aktivierung des Kanals, durch die es zur Öffnung der Kanalpore kommt. Die Öffnung ermöglicht schließlich den Ionenfluss. In Abhängigkeit von Agonist und Ionenkanal können auch mehrere Bindungsschritte zur Öffnung des Kanals nötig sein. Die Anzahl der Bindungsschritte lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten ableiten. Beim ersten Modellierungsversuch sind wir von 2 Bindungsschritten ausgegangen, da der Hill-Koeffizient bei 1.8 liegt.

Das Simulationsmodell ohne Block:



rate		
K_{on}	3,500,000	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
K_{off}	60	s^{-1}
α	140	s^{-1}
β	4000	s^{-1}

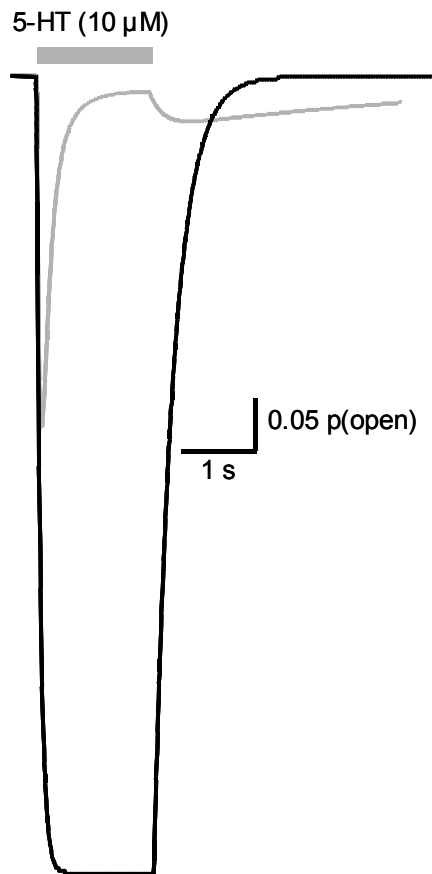


Abb. 5.6.1-1: Stromkurve eines Simulationsmodells ohne Block (schwarz) im Vergleich zur Endfassung des Modells (grau).

Im Vergleich zu den experimentell gewonnenen Spuren ist bei dieser simulierten Stromspur der Kurvenverlauf kastenförmig, d.h. der Stromanstieg verläuft sehr schnell, ebenso die Deaktivierung. Die Desensitierung sowie die Nachströme lassen sich mit diesem Modell nicht simulieren.

5.6.2. Das Simulationsmodell mit einem Block

Zur Weiterentwicklung des Modells integrierten wir in das Schema einen Blockadeschritt. Bei den Block-Raten wurden die Rück-Raten deutlich geringer als die Hin-Raten gewählt. Die übrigen Raten wurden aus dem obigen Schema unverändert übernommen. Der Versuch wurde mit einem „Low-Affinity-Block“ als auch mit einem „High-Affinity-Block“ simuliert.

Das Simulationsmodell für den „Low Affinity Block“:

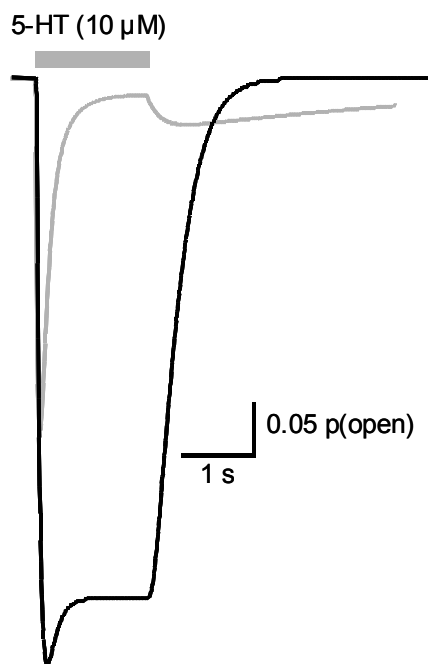
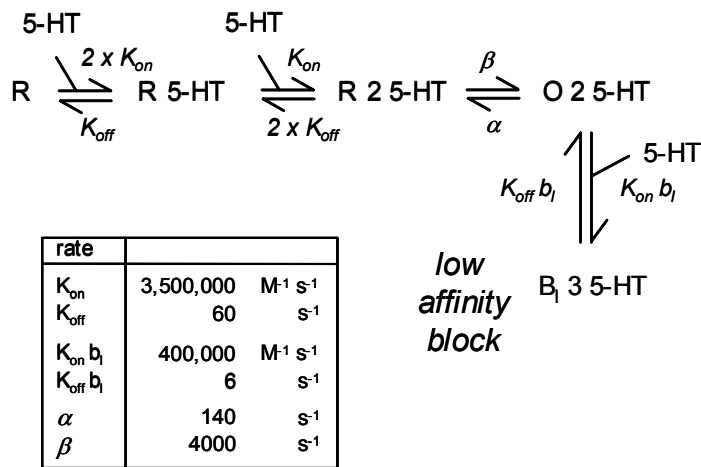
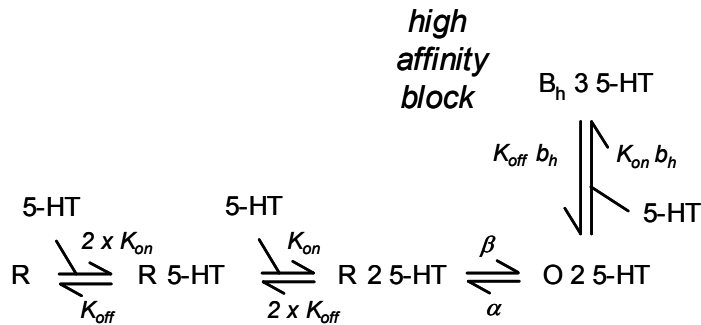


Abb. 5.6.2-1: Stromkurve eines Simulationsmodells mit „Low-Affinity-Block“ (schwarz).

Der Vergleich mit der experimentellen Stromspur zeigt, dass sich die Kurvenform der gemessenen Spur leicht annähert. Die simulierte Spur weist wie bei dem vorherigen Modell eine schnelle Stromanstiegsszeit, sowie eine schnelle Deaktivierung auf. Weiterhin ist es jedoch nicht möglich, die Desensitivierung und die Nachströme zu simulieren.

Das Modell mit dem „High Affinity Block“:



rate		
K_{on}	3,500,000	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
K_{off}	60	s^{-1}
$K_{\text{on}} b_h$	1,300,000	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
$K_{\text{off}} b_h$	0.2	s^{-1}
α	140	s^{-1}
β	4000	s^{-1}

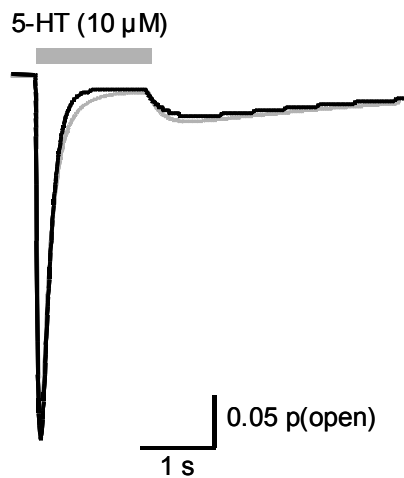


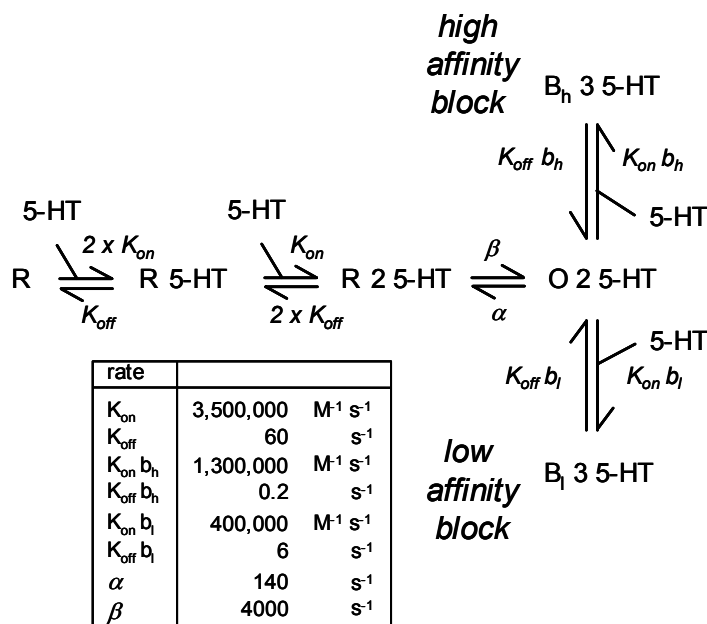
Abb. 5.6.2-2: Stromkurve eines Simulationsmodells mit „High-Affinity-Block“ (schwarz).

Durch die Veränderung der Block-Raten gelang es in der Simulation, der experimentellen Stromspur deutlich näher zu kommen. Bei der Desensitisierung ist der Verlauf jedoch nur monophasisch (ohne die langsame Komponente). Im Gegensatz zum vorherigen Modell weist die Stromspur nun einen Nachstrom auf. Dessen Anstiegszeit ist jedoch zu langsam, während hingegen die Deaktivierung des Nachstroms der experimentellen Stromspur entspricht.

5.6.3. Endfassung des Simulationsmodells für den 5-HT_{3A}-Rezeptor

Die Endfassung des Simulationsmodells vereinigt die bisher erarbeiteten Teilschritte aus den vorher beschriebenen Modellen. Das Modell geht wie in den vorausgegangenen Modellen von 2 Bindungsschritten aus und verfügt über die identischen Rück-Raten aus dem Modell unter 5.6.3. Die Erneuerung bei diesem Modell besteht in der Einführung eines weiteren Blockes, so dass das neue Modell über 2 Blockschritte verfügt. Die beiden Blöcke unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität.

Endfassung des Modells:



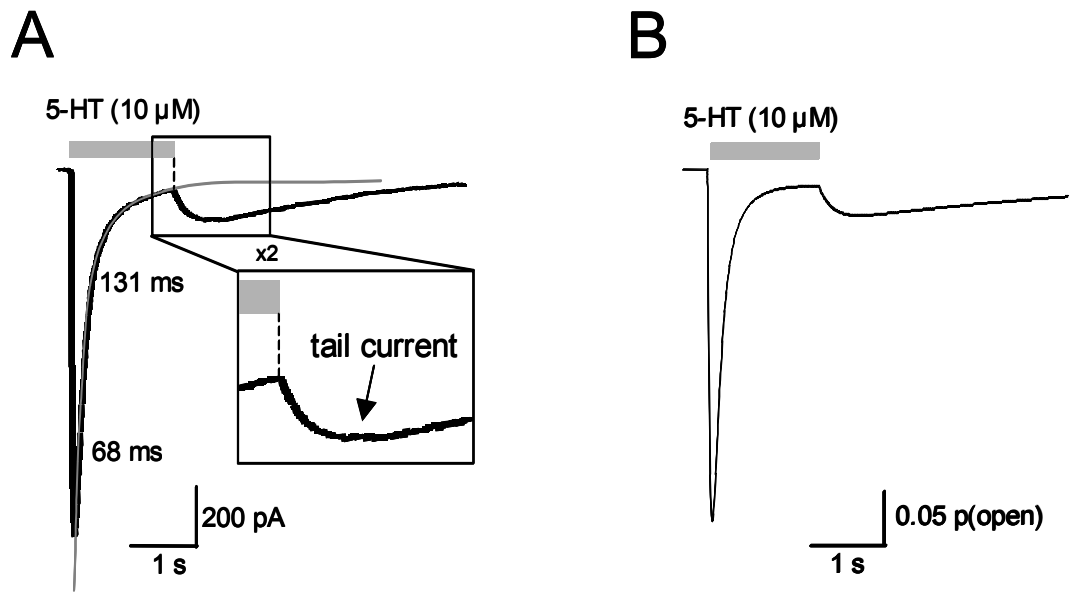


Abb. 5.6.3-1: Vergleich einer experimentell gewonnenen Stromspur (A) mit simulierter Stromkurve (B) mit guter Übereinstimmung.

Die simulierte Spur zeigt sehr gute Übereinstimmung mit den Stromspuren aus den Experimenten. Das entwickelte Modell ermöglicht die Simulation sowohl des biphasischen Desensitisierungsverlaufs als auch eines Nachstroms mit relativ steilem Anstieg und einer sehr langsamen Deaktivierung. Dieses Modell kann nun als Grundlage für weitere Untersuchungen am 5-HT_{3A}-Rezeptor nützlich sein.

6. Diskussion

Obwohl die Kinetik des 5-HT_{3A}-Rezeptors seit Jahren Forschungsgegenstand vieler Arbeitsgruppen ist, bleiben bis heute noch eine Reihe von Fragen zur Funktion des Rezeptors offen. In dieser Arbeit haben wir anhand elektrophysiologischer Messungen, ergänzt durch kinetische Modellierung, die Funktionsweise des humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors untersucht.

Da Ca²⁺-Ionen die Stromantwort des 5-HT_{3A}-Rezeptors reduzieren und dessen Desensitisierung beschleunigen (Lobitz et al., 2001), haben wir sämtliche Messungen in Ca²⁺-freier Extrazellulär-Lösung durchgeführt.

6.1. Die Desensitisierung am 5-HT_{3A}-Rezeptor

Die Abnahme des Ionenflusses durch aktivierte Ionenkanäle kommt entweder durch Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor (Deaktivierung) oder durch Desensitisierung zustande (Jones und Westbrook, 1996). Unter Desensitisierung versteht man den Übergang des aktivierten Kanals in einen inaktiven Zustand bei bestehender Bindung zwischen Agonist und Rezeptor. Desensitisierung ist eine typische Eigenschaft der meisten Liganden-gesteuerten Ionenkanäle und wurde auch für den homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptors beschrieben (Reeves und Lummis, 2002). Auch unsere Messungen zeigten den typischerweise biphasischen Verlauf der Rezeptor-Desensitisierung, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. Bei der raschen Entfernung des Agonisten von der 5-HT_{3A}-Rezeptoren-tragenden Zellen fiel ein vorübergehender Wiederanstieg der Stromantwort auf. Die anschließende Kanal-Deaktivierung zeigte einen sehr langsamen Zeitverlauf. Diese sog. Nachströme lassen sich durch die Umkehrung eines durch den Agonisten 5-HT bewirkten Offenkanal-Blocks erklären. Ausgehend von diesem Befund entwickelten wir ein kinetisches Modell für den 5-HT_{3A}-Rezeptor, das die Desensitisierung dieses Ionenkanals durch einen Agonist-induzierten Offenkanal-Block erklärt.

Mit einem Grundschema, in dem der offene Kanal durch ein 5-HT-Molekül blockiert wird lässt sich die Desensitisierung und die Entstehung eines Nachstroms gut nachvollziehen. Die Erweiterung des Grundschemas um einen zusätzlichen Blockade-Schritt ermöglicht die Simulation sowohl des biphasischen Desensitisierungsverlaufs als auch eines Nachstroms mit relativ steilem Anstieg und einer sehr langsamen Deaktivierung (siehe Abb. 5.6.3-1).

In einigen Veröffentlichungen über den 5-HT_{3A}-Rezeptor (Brown et al., 1998; Mariq et al., 1991) sind Nachströme nicht erwähnt. Stattdessen zeigen die 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Ströme typischerweise eine relativ langsame Rezeptor-Deaktivierung. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass der Agonist langsamer als bei unseren Experimenten von den Rezeptoren entfernt wurde und dadurch die Nachströme in die Länge gezogen werden und somit schlecht erkennbar sind. Die Arbeitsgruppe von Mott verwendeten bei ihren Experimenten, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, ein schnelles Applikationssystem (Mott et al., 2001). In ihrer Arbeit war die Deaktivierungszeit ähnlich langsam oder langsamer als die Desensitisierungszeit, was mit unseren Ergebnissen gut übereinstimmt. Jedoch sind auch in dieser Publikation keine Nachströme erwähnt worden. Es fällt allerdings auf, dass bei einigen Abbildungen (Mott et al. 2001) der Zeitverlauf der Whole-Cell Ströme nach Beendigung der Agonistenapplikation abgeschnitten ist.

Andererseits gibt es einige Publikationen zum 5-HT_{3A}-Rezeptor, in deren Abbildungen Nachströme zu sehen sind, - sie werden im Text allerdings nicht weiter erwähnt (Dubin et al., 1999; Gunthorpe und Lumnis, 2001). Interessanterweise wird in einer früheren Arbeit von Gunthorpe und Lumnis (1999), in der die Autoren die Wirkung von Diltiazem (Ca²⁺-Kanal-Blocker vom L-Typ) auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor der Maus untersuchten, das "Wiedererscheinen des Einwärtsstroms" (was wir Nachstrom nennen) mit einem Offenkanal-Block-Mechanismus in Zusammenhang gebracht. Dieser Mechanismus wird auch durch ein einfaches kinetisches Schema erklärt. Darüber hinaus gibt es eine Arbeit (Kooyman et al., 1994), die zeigt, dass 5-Hydroxyindol in hohen Konzentrationen den 5-HT₃-Rezeptor blockiert und beim Wash-Out Nachströme auslöst. Niedrige Konzentrationen dieser Substanz verstärken hingegen den 5-HT-induzierten Strom. Dieser Befund passt insofern gut zu unseren Überlegungen, als dass wir für den Agonisten 5-HT ebenfalls zwei unterschiedliche Bindungsstellen annehmen, durch die zwei gegensätzliche Wirkungen vermittelt werden. Die Bindungsstellen innerhalb der Kanalpore (die den Offen-Kanal-Block vermitteln) lassen sich auch dadurch begründen, dass Mutationen in der Kanal-bildenden Domäne klonierter 5-HT₃-Rezeptor deren Desensitisierung stark verändern können (Yakel et al., 1993; Gunthorpe et al., 2000; Lobitz et al., 2001), insbesondere unter Ca²⁺-freien Bedingungen.

6.2. Die Effekte von mCPBG auf den 5-HT_{3A}-Rezeptor

Der (nicht natürliche) spezifische 5-HT₃-Rezeptor-Agonist mCPBG induzierte in unseren Experimenten mit den heterolog exprimierten homomeren 5-HT₃-Rezeptoren ähnliche Stromantworten wie der natürliche Agonist 5-HT. Ebenso wie 5-HT bewirkte auch mCPBG einen Offenkanalblock. Dies zeigte sich ebenfalls am Auftreten der Nachströme im Moment der schnellen Entfernung dieses Agonisten von den Rezeptoren. Ein mCPBG-induzierter Offenkanalblock an klonierten 5-HT_{3A}-Rezeptoren wurde auch bereits beschrieben (Lankiewicz et al., 1998). Diese Kanal-Block-Eigenschaft ist offenbar bei mCPBG stärker ausgeprägt als beim natürlichen Agonisten 5-HT. Dies zeigte sich in unseren Experimenten insbesondere daran, dass bei höheren mCPBG-Konzentrationen die induzierten Stromantworten wieder kleiner wurden, da hierbei die blockierende Komponente die agonistische Komponente überwiegt. Es resultiert eine sog. glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurve hinsichtlich der Größe der Stromantworten.

Im Unterschied zu 5-HT dauert es nach Kanalaktivierung durch mCPBG wesentlich länger, bis die Rezeptoren wieder voll erregbar sind (ca. 50 s gegenüber 25 s). Die Resensibilisierungszeit ist also länger. Ähnlich lange Resensibilisierungszeiten sind auch für mCPBG-aktivierte 5-HT₃-Rezeptoren der Maus beschrieben worden (van Hooft und Vijverberg, 1996).

Die genannten funktionellen Unterschiede dieser beiden Agonisten sind besonders dann zu berücksichtigen, wenn man mit mCPBG etwa in Schnittpräparaten selektiv native 5-HT₃-Rezeptoren untersuchen möchte.

6.3. Die physiologische Bedeutung des Agonist-induzierten Offenkanalblocks

Es gibt wenige Arbeiten, die sich mit der physiologischen Bedeutung eines Agonist-induzierten Offenkanalblocks beschäftigen. Die Arbeitsgruppe von Legendre beschreibt, dass solch ein Mechanismus am Azetylcholin-Rezeptor die postsynaptische Antwort an der motorischen Endplatte reguliert und somit als biophysikalischer Mechanismus zur Verstärkung der neuromuskulären Übertragung dient (Legendre et al., 2000). Allerdings ist unklar, welche Relevanz dieser Mechanismus am 5-HT₃-Rezeptor hat, zumal der von uns untersuchte homomere 5-HT_{3A}-Rezeptor lediglich ein Modell für den nativ exprimierten 5-HT₃-Rezeptor darstellt. Die direkte Messung 5-HT₃-Rezeptor-vermittelter synaptischer Antworten, z.B. an einem Hirnschnittpräparat, ist bislang noch nicht gelungen. Deshalb ist über die Funktion postsynaptisch lokalisierter 5-HT₃-Rezeptoren wenig bekannt. Möglicherweise stellt der hier beschriebene Kanalblock ein regulatorisches Prinzip des 5-HT₃-Rezeptors dar. Im Unterschied zum Agonist-induzierten Kanalblock des Azetylcholin-Rezeptors (Legendre et al., 2000) ist der von uns beschriebene Block am 5-HT_{3A}-Rezeptor spannungsunabhängig. Dies widerspricht der unter Elektrophysiologen weit verbreiteten Ansicht, dass die Spannungsabhängigkeit ein notwendiges Kennzeichen eines Offenkanalblocks ist. Dem ist offensichtlich nicht so. Ein ebenfalls spannungsunabhängiger Kanalblock durch das Anästhetikum Isofluran am GABA_A-Rezeptor wurde bereits beschrieben (Haseneder et al., 2002).

6.4. Inwieweit beschreibt das kinetische Modell den 5-HT_{3A}-Rezeptor

Mit Hilfe eines selbst entwickelten kinetischen Modells wurden die gemessenen 5-HT_{3A}-Rezeptor-vermittelten Ionenströme simuliert. Hierbei sollte ein möglichst einfaches Modell die kinetischen Eigenschaften des humanen homomeren 5-HT₃-Rezeptors möglichst gut beschreiben.

Ein Detail, das mit dem erstellten Modell allerdings nicht nachsimuliert werden konnte, ist der sigmoide Zeitverlauf in der frühen Resensibilisierungsphase, wie er auch bei Experimenten

am 5-HT₃-Rezeptor der Maus beobachtet wurde (van Hooft und Vijverberg, 1996). Dieser Befund könnte mit einem mehrschrittigen Mechanismus simuliert werden, wie von van Hooft und Vijverberg vorgeschlagen. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung von dynamischen Raten anstatt von Raten-Konstanten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine solche Simulation verzichtet, da sich die Hauptaussage unserer kinetischen Beschreibung dadurch nicht grundlegend ändern würde. Andererseits ist auch ein einfach-exponentieller Resensitisierungszeitverlauf (für den 5-HT₃-Rezeptor der Maus) beschrieben worden (Mott et al., 2001), wie wir ihn mit unserem Modell simulieren.

Der Zeitverlauf der Rezeptordeaktivierung (Stromabfall nach Entfernung des Agonisten) wurde an Stromantworten auf sehr kurze Agonistenpulse ausgemessen, da es hierbei kaum zum Offenkanalblock durch den Agonisten kommt. Deshalb folgten auf diese kurzen Agonistenpulse (< 50 ms) keine Nachströme. In der Regel war der Zeitverlauf der Deaktivierung monophasisch und konnte mit einer Zeitkonstante (ca. 100-200 ms) beschrieben werden. Auf der Grundlage dieser Befunde wurde das kinetische Modell bis zur dargestellten Endversion weiterentwickelt, um auch diese Experimente mit kurzen 5-HT-Pulsen zu simulieren. Entsprechend ist die Deaktivierung der simulierten Ströme monophasisch. Allerdings zeigten manche der von uns aufgenommenen Stromspuren eine biphasische Deaktivierung, wie sie auch von Mott (Mott et al., 2001) beschrieben ist. Dennoch verzichteten wir auf eine Erweiterung des Modells, da das Ziel unserer Arbeit in der kinetischen Beschreibung des 5-HT_{3A}-Rezeptors durch ein möglichst einfaches Modell bestand. Insgesamt eignet sich das von uns entwickelte Modell gut zur Beschreibung der kinetischen Eigenschaften des 5-HT_{3A}-Rezeptors.

6.5. Was bringt die kinetische Modellierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors für das Verständnis serotoninerger Mechanismen

Die bisherigen elektrophysiologischen Daten zu verschiedenen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen zeigen, dass die Rezeptor-spezifische Desensitisierungskinetik großen Einfluss auf Stärke, Zeitverlauf und Frequenz der synaptischen Transmission hat (Jones und Westbrook, 1996).

Unser kinetisches Modell beschreibt einen Agonist-induzierten Offenkanalblock als den entscheidenden Mechanismus der Rezeptor-Desensitisierung beim 5-HT_{3A}-Rezeptor. Ein solches Funktions- und Regulationsprinzip ist für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle so gut wie noch nicht beschrieben worden. Innerhalb einer synaptischen Verschaltung könnte ein Transmitter durch einen Offenkanalblock u.a. einen negativen Feedbackmechanismus am Ionenkanal bewirken. Unserer Einschätzung nach besteht die besondere Bedeutung eines derartigen Mechanismus darin, dass eine Rezeptorantwort besonders sensibel auf die (synaptische) Transmitter-Konzentration reagieren kann. Möglicherweise gibt es sogar eine "optimale" Transmitter-Konzentration, um eine möglichst große serotoninerge Rezeptorantwort hervorzurufen. Wie serotoninerge Synapsen letztendlich funktionieren, konnte bislang allerdings noch nicht ermittelt werden, da solche Messungen äußerst schwierig sind. Unser Modell könnte aber helfen, künftige Daten zur serotoninergen synaptischen Transmission zu interpretieren.

7. Zusammenfassung

Der 5-HT₃-Rezeptor ist aus psychiatrischer Sicht insofern von großem Interesse, da dieser Liganden-gesteuerte Ionenkanal aus dem serotoninergeren System bei der Regulation von Affekt und Wahrnehmung eine Rolle spielt. Bis heute sind die Regulationsmechanismen serotoninerger Synapsen jedoch unklar. Da direkte Messung 5-HT₃-Rezeptor-vermittelter synaptischer Antworten schwer durchzuführen sind, ist es sinnvoll, mithilfe indirekter Methoden weitere Erkenntnisse über dieses Transmittersystem zu gewinnen. Eine Möglichkeit, um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle in vitro elektrophysiologisch zu untersuchen ist die Kultivierung neuronaler Zellen, die native 5-HT₃-Rezeptoren exprimieren. Vorteilhafter ist die isolierte Betrachtung der funktionellen Rezeptor-Aktivität anhand heterolog exprimierter Rezeptoren. Wir verwendeten als Modell für neuronale 5-HT₃-Rezeptoren, den humanen homomeren 5-HT_{3A}-Rezeptor, welcher in HEK 293-Zellen heterolog exprimiert wurde. Mittels Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration konnten wir Agonist-induzierte Stromantworten ableiten, die in Strom-Zeit-Diagrammen aufgezeichnet wurden. Die experimentell gewonnen Daten haben wir mit kinetischer Modellierung ergänzt.

Wir untersuchten Aktivierung, Deaktivierung, Desensibilisierung und Resensibilisierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors und erstellten ein kinetisches Modell, das die Rezeptor-Kinetik anschaulich beschreibt. Besonderes Interesse galt insbesondere dem Mechanismus der Rezeptor-Desensibilisierung, da sie mutmaßlich Stärke, Zeitverlauf und Frequenz der serotoninergeren synaptischen Transmission beeinflusst. Unser kinetisches Modell beschreibt auf der Basis der Patch-Clamp-Messungen einen Agonist-induzierten Offenkanal-Block als entscheidenden Mechanismus der Desensibilisierung. Im Gegensatz zu den meisten Liganden-gesteuerten Ionenkanälen bewirkt der Agonist Serotonin die Rezeptor-Desensibilisierung durch direkte Blockade der geöffneten 5-HT_{3A}-Rezeptor-Kanäle. Durch diesen Mechanismus könnte die synaptisch wirksame Transmitter-Konzentration die Rezeptorantwort maßgeblich steuern. Im Unterschied zum ACh-Rezeptor war dieser Agonist-induzierte Blockmechanismus nicht spannungsabhängig und zeigt somit, dass die Spannungsabhängigkeit kein notwendiges Kennzeichen eines Offenkanalblocks ist.

Diese Ergebnisse können dazu beitragen die komplexen Mechanismen an serotoninerger Synapsen weiter aufzuklären. Dabei könnte unser für den 5-HT_{3A}-Rezeptor entwickeltes kinetisches Modell bei der Interpretation künftiger Daten zur serotoninerger Transmission hilfreich sein.

8. Literaturverzeichnis

- Barnes N. M., Sharp T. (1999): A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38:1083-1152.
- Belelli D., Balcarek J. M., Hope A. G., Peters J. A., Lambert J. J., Blackburn T. P. (1995): Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3_{AS} receptor subunit. *Mol. Pharmacol.* 48:1054-1062.
- Brown A. M., Hope A. G., Lambert L. L., Peters J. A. (1998): Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT₃ receptor subunit (h5-HT_{3A}). *J. Physiol.* 507:653-665.
- Brunello N., Masotto C., Steardo L., Markstein R., Racagni G. (1995): New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropharmacology*. 13:1777-213.
- Carbonell L. F., Klowden M. J., Miller L. K. (1985): Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J. Virol.* 56:153-160.
- del Castillo J., Katz B. (1957): Interaction at endplate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 146:369-381.
- Chen C., Okayama H. (1988): Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Bio. Techniques*. 6:632-638.
- Clements J.D. (1996): Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* 19:163-171.
- Colquhoun D., Ogden D. C. (1988): Activation of ion channels in the frog endplate by high concentrations of acetylcholin. *J. Physiol.* 395:131-159.

-
- Colquhoun D., Jonas P., Sakmann B. (1992): Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptors in the patches from different neurones of rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)*. 458:261-287.
- Costall B., Naylor R.J. (1994): 5-HT₃ receptor antagonists in the treatment of cognitive disorders. In: 5-Hydroxytryptamin₃ receptor antagonists, King F. D., Jones B. J., Sanger G. J. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton. 155-181.
- Davies P. A., Pistis M., Hanna M. C., Peters J. A., Lambert J. J., Hales T. G., Kirkness E. F. (1999): The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin receptor function. *Nature*. 397:359-363.
- Dubin A. E., Huvar R., D'Andrea M. R., Pyati J., Zhu J. Y., Joy K. C., Wilson S. J., Galindo J. E., Glass C. A., Luo L., Jackson M. R., Lovenberg T. W., Erlander M. G. (1999): The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J. Biol. Chem.* 274:30799-30810.
- Dudel J., Franke C., Hatt H., Ramsey R. L., Usherwood P. N. (1988): Rapid activation and desensitization by glutamate of excitatory, cation-selective channels in locust muscle. *Neurosci. Lett.* 88:33-38.
- Edmonds B., Gibb A. J., Colquhoun D. (1995): Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu. Rev. Physiol.* 57:495-519.
- Eiselé J.-L., Bertrand S., Galzi J.-L., Devillers-Thiery A., Changeux J. P., Bertrand D. (1993): Chimeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature*. 366:479-483.
- Fatt P., Katz B. (1952): Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)* 117:109-128.
- Felgner P. L. (1987): A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:7413-7417.

Franke C., Hatt H., Dudel J. (1987): Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membrane of crayfish muscle. *Neurosci. Lett.* 77:199-204.

Günzburg W. H., Salmons B. (1997): Physikalische Gentransfermethoden. In: Gentransfer in Säugetierzellen, Günzburg W. H., Salmons B. (Hrsg.), *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, 1.Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford.19-32.

Gunthorpe M. J., Lummis S. C. R. (2001): Conversion of the ion selectivity of the 5-HT_{3A} receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J. Biol. Chem.* 276:10977-10983.

Gunthorpe M. J., Lummis S. C. R. (1999): Diltiazem causes open channel block of recombinant 5-HT₃ receptors. *J. Physiol.* 519:713-722.

Gunthorpe M. J., Peters J. A., Gill C. H., Lambert L. L., Lummis S. C. R. (2000): The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT_{3A} receptors. *J. Physiol.* 522:187-198.

Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. (1981): Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100.

Hanna M. C., Davies P. A., Hales T. G., Kirkness E. F. (2000): Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J. Neurochem.* 75:240-247.

Hargreaves A. C., Lummis S. C. R., Taylor C. W. (1994): Ca²⁺ permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 46:1120-1128.

Haseneder R., Rammes G, Zieglgänsberger W, Kochs E, Hapfelmeier G. (2002): GABA(A) receptor activation and open-channel block by volatile anaesthetics: a new principle of receptor modulation?. *Eur J Pharmacol.* 451:43-50.

Heckmann M., Dudel J. (1997): Desensitization and resensitization kinetics of glutamate receptor channels from *Drosophila* larval muscle. *Biophys. J.* 72:2160-2169.

Hollmann M., Heinemann S. (1994): Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108.

Huganir R. L., Delcour A. H., Greengard P., Hess G. P. (1986): Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature.* 321:774-776.

Jonas P., Spruston N. (1994): Mechanisms shaping glutamate-mediated excitatory postsynaptic currents in the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:366-372.

Jones B. J., Piper D. C. (1994): 5-HT₃ receptor antagonists in anxiety. In: 5-Hydroxytryptamin₃ receptor antagonists, King F. D., Jones B. J., Sanger G. J. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton. 155-181.

Jones M. V., Westbrook G. L. (1996): The impact of receptor desensitization on the fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 19:96-101.

Johnston S. A., Tang D. C. (1994): Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. *Methods Cell. Biol.* 43:353-365.

Katz B., Thesleff S. (1957.): A study of 'desensitization' produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol. (Lond.)*. 138:63-80.

Kooyman A. R., van Hooft J. A., Vanderheijden P. M., Vijverberg H. P. (1994): Competitive and non-competitive effects of 5-hydroxyindole on 5-HT₃ receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 112:541-546.

Koyama S., Matsumoto N., Kubo C., Akaike N. (2000): Presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. *J. Physiol.* 529:373-383.

-
- Lankiewicz S., Lobitz N., Wetzel C. H., Rupprecht R., Gisselmann G., Hatt H. (1998): Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine₃ receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol. Pharmacol.* 53:202-212.
- Ledley F. D. (1995): Nonviral gene therapy: the promise of the genes as pharmaceutical products. *Human Gene Therapy.* 6:1129-1144.
- Legendre P., Ali D. W., Drapeau P. (2000): Recovery from open channel block by acetylcholine during neuromuscular transmission in zebrafish. *J. Neurosci.* 20:140-148.
- Liu Y., Dilger J. P. (1991): Opening rate of acetylcholine receptor channels. *Biophys. J.* 60:424-432.
- Lobitz N., Gisselmann G., Hatt H., Wetzel C. H. (2001): A single amino-acid in the TM1 domain is an important determinant of the desensitization kinetic of recombinant human and guinea pig alpha-homomeric 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 59:844-851.
- McCray J. A., Trentham D. R. (1989): Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18:239-270.
- MacMahon L. L., Kauer J. A. (1997): Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J. Neurophysiol.* 78:2493-2502.
- Maconochie D. J., Knight D. E. (1992): Markov modelling of ensemble current relaxation: bovine adrenal nicotinic receptor currents analysed. *J. Physiol. (Lond.).* 454:155-182.
- Maconochie D. J., Steinbach J. H. (1998): The channel opening rate of adult- and fetal-type mouse nicotinic receptors activated by acetylcholine. *J. Physiol (Lond.).* 506:53-72.

-
- Maricq A.V., Peterson A. S., Brake A. J., Myers R. M., Julius D. (1991): Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*. 254:432-437.
- Marston F. A. O., Hartley D. L. (1990): Solubilization of protein aggregates. *Meth. Enzymol.* 182:264-276.
- Methfessel C., Witzemann V., Takahashi T., Mishina M., Numa S., Sakmann B. (1986): Patch-clamp measurement on *Xenopus laevis* Oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Arch.* 407:577-588.
- Morales M., Battenberg E., Lecea L., Bloom F. E. (1996): The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Res.* 731:199-202.
- Möller H.J., Laux G., Deister A. (1995): Psychiatrie. *Hippokrates Verlag Stuttgart* (Duale Reihe) 1. Auflage, - Stuttgart.
- Mott D. D., Erreger K., Banke T. G., Traynelis S. F. (2001): Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J. Physiol.* 535:427-443.
- Mühlhardt C. 2000: Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Aufl. – Heidelberg, Berlin.
- Numberger M., Draguhn A. (1996): Spezielle Anwendungen der Patch-Clamp-Technik. In: Patch-Clamp-Technik, Numberger M., Draguhn A. (Hrsg.), *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, 1. Auflage, - Heidelberg, Berlin, Oxford. 143-187.
- Ortells M.O., Lunt G.G. (1995): Evolutionary history of the ligand-gated ion superfamily of the receptors. *Trends Neurosci.* 18:121-127.

-
- Parker R. M., Barnes J. M., Ge J., Barber P.C., Barnes N. M. (1996): Autoradiographic distribution of [³H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in the human brain. *J. Neurol. Sci.* 144:119-127.
- Petrides P.E. (1997) Nervengewebe. In: Biochemie und Pathobiochemie, Löffler G., Petrides P.E., (Hrsg.), *Springer Verlag*, 5. Auflage, Berlin. 971-993.
- Potter H. (1993): Applikation of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol.* 217:461-483.
- Pratt G. D., Bowery N. G. (1989): The 5-HT₃ receptor ligand [3H]BRL 43694 binds to presynaptic sites in the Nucleus Tractus Solitarius of the rat. *J. Neurochem.* 70:1094-1103.
- Reeves D. C., Lummis S. C. R. (2002): The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel. *Mol. Membr. Biol.* 19:11-26.
- Roerig B., Nelson D. A., Katz L. C. (1997): Fast synaptic signalling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex. *J. Neurosci.* 17:8353-8362.
- Schuster C. M., Ultsch A., Schloss P., Cox J. A., Schmitt B., Betz H. (1991): Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. *Science.* 254:112-114.
- Seeburg P. H. (1993): The TIPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:297-303.
- Shao X. M., Yakel J. L., Jackson. M. B. (1991): Differentiation of NG108-15 cells alters channel conductance and desensitization kinetics of the 5-HT₃ receptor. *J. Neurophysiol.* 65:630-638.
- Sine S. M., Seinbach J. H. (1984): Agonists block currents through acetylcholine receptor channels. *Biophys. J.* 46:277-284.

Stryer L. (1994): Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, 4. Auflage, - Heidelberg, Berlin, Oxford.

Sugita S., Shen K. Z., North R. A. (1992): 5-Hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₃ receptors in rat lateral amygdala. *Neuron*. 8:199-203.

Sun Y., Olson R., Horning M., Armstrong N., Mayer M., Gouaux E. (2002): Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*. 417:245-253.

Tecott L. H., Maricq A. V., Julius D. (1993): Nervous system distribution of the Serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Neurobiology*. 90:1430-1434.

Unwin N. (1993): Neurotransmitter Action: Opening of ligand-gated ion channel. (*Cambridge, Mass*) *Cell*. 72 (Suppl.):31-41.

Usherwood P. N. R. (1994): Insect glutamate receptors. *Adv. Insect. Physiol.* 24:309-341.

van Hooft J. A., Vijverberg H. P. M. (2000): 5-HT₃ receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story? *Trends Neurosci.* 23:605-610.

van Hooft, J. A., Vijverberg H. P. M. (1996): Selection of distinct conformational states of the 5-HT₃ receptor by full and partial agonists. *Br. J. Pharmacol.* 117:839-846.

Waxham N. M. (1999): Neurotransmitter Receptors. In: Fundamental Neuroscience, Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L., Squire L. R., Academic Press, San Diego, California, 235-267.

Yakel J. L. (1996): Desensitization of 5-HT₃ receptors expressed in *Xenopus* oocytes: dependence on voltage and primary structure. *Behav. Brain. Res.* 73:269-272.

Yakel J. L. (1992) 5-HT₃ receptors as cation channels. In: Central and Peripheral 5-HT₃ Receptors, M. Hamon (Hrsg.), Academic Press, London. 102-128.

Yakel J. L., Lagrutta A., Adelman J. P., North R. A. (1993): Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5030-5033.

Yang J. (1990): Ion permeation through 5-hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J. Gen. Physiol.* 96:1177-1198.

Yang N. -S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D. (1990): In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9568-9572.

9. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 2.1.1-1	Schematische Darstellung eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals	Seite 10
Abb. 2.1.1-2	Schematische Darstellung der transmembranären Domänen eines Ionenkanals vom ACh-Typ.	Seite 11
Abb. 2.4.1-1	Schematische Darstellung der Whole-Cell-Konfiguration	Seite 22
Abb. 2.5-1	Reaktionsschema eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals	Seite 24
Abb. 2.5.1-1	Reaktionsschema für den Glutamatrezeptor	Seite 25
Abb. 2.5.2-1	Reaktionsschema für den ACh-Rezeptor	Seite 27
Abb. 4.2.3-1	Darstellung des piezobetriebenen Applikationssystems	Seite 32
Abb. 4.2.3-2	Darstellung des zeitlichen Ablaufs von Applikation u. Desapplikation	Seite 32
Abb. 5.1-1	Darstellung der Dosis-Wirkungskurve des 5-HT _{3A} -Rezeptors	Seite 38
Abb. 5.1-2	Darstellung der 5-HT-induzierten Stromantwort bei verschiedenen Konzentrationen	Seite 39
Abb. 5.1-3	Darstellung der Stromanstiegszeiten des 5-HT _{3A} -Rezeptors bei unterschiedlicher 5-HT-Konzentration	Seite 40
Abb. 5.2-1	Repetitive Serotonin-Pulse mit unterschiedlichen Zeitintervallen zur Untersuchung der Desensitisierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors	Seite 41
Abb. 5.2-2	Graphische Darstellung der Erholungskinetik des 5-HT _{3A} -Rezeptors.	Seite 42
Abb. 5.3-1	Einfluss der Applikationsdauer von 5-HT auf die Stromantwort des 5-HT _{3A} -Rezeptors	Seite 43
Abb. 5.4-1	Darstellung der Strom-Spannungs-Beziehung bei Aktivierung des 5-HT _{3A} -Rezeptors	Seite 44
Abb. 5.4-2	Darstellung der Applikation des selektiven 5-HT ₃ -Rezeptor-Antagonisten Y25130 (10 nM) am 5-HT _{3A} -Rezeptor	Seite 45
Abb. 5.5-1	Dosis-Wirkungskurve mit mCPBG am 5-HT _{3A} -Rezeptor	Seite 46
Abb. 5.5-2	Stromspuren mit mCPBG unterschiedlicher Konzentrationen	Seite 46
Abb. 5.5-3	mCPBG-Originalspuren von repetitiven Pulsen mit unterschiedlichen Zeitintervallen	Seite 47
Abb. 5.5-4	Darstellung der Erholungskinetik des 5-HT _{3A} -Rezeptors mit mCPBG	Seite 47
Abb. 5.6.1-1	Darstellung der Stromkurve eines Simulationsmodells ohne Block	Seite 49
Abb. 5.6.2-1	Darstellung der Stromkurve eines Simulationsmodells mit „Low Affinity Block“	Seite 50
Abb. 5.6.2-2	Darstellung der Stromkurve eines Simulationsmodells mit „High Affinity Block“	Seite 51
Abb. 5.6.3-1	Unser Simulationsmodell für den 5-HT _{3A} -Rezeptor mit dazugehöriger Stromspur, sowie der experimentellen Stromspur	Seiten 52/53

10. Danksagungen

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. R. Rupprecht der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Überlassung des Themas und die Durchsicht dieser Arbeit.

Herzlichen Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. W. Ziegelgänsberger für die vielfältigen Arbeitsmöglichkeiten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie.

Großen Dank möchte ich besonders Herrn Dr. med. G. Hapfelmeier aussprechen für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten in der Elektrophysiologie, die stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen und Korrekturen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. med. R. Haseneder, der mir das “Patchen” beibrachte und mir bei der Auswertung des Datenmaterials half.

Herzlichster Dank auch meinem Freund G. Metzger, der mir bei sämtlichen Computerfragen immer geduldig beiseite stand und immer eine Lösung wusste.

Dank gilt auch Herrn S. Schmidt für die sorgfältige und gewissenhafte Pflege der Zellkultur

und zu guter letzt (und nicht minder wichtig) möchte ich mich besonders herzlich bei Frau P. Surbir bedanken, die auch die Zellkultur hütete und immer für gute Laune im Labor sorgte.

11. Anhang

11.1. Lösungen, Chemikalien, Medien

DMSO	Merck, Darmstadt, BRD
FKS	Biochrom KG, Berlin, BRD
Serotonin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Penicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Trypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, BRD

MEM(Minimal Essential Medium), Gibco BRL, Eggenstein, BRD:

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	264,0 mg/l
KCL	400,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200,0
NaCl	6800,0
NaHCO ₃	200,0
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	158,0
D-Glucose	1000,0
Phenolrot	10,0
L-Arginin-HCL	126,0
L-Cystin	24,0
L-Histidin HCl x H ₂ O	42,0
L-Isoleucin	52,0
L-Leucin	52,0
L-Lysin x HCL	73,0
L-Methionin	15,0
L-Phenylalanin	32,0
L-Threonin	48,0
L-Tryptophan	10,0
L-Thyrosin	10,0
L-Valin	46,0
D-Ca Pantothenat	1,0
Colinchlorid	1,0
Folsäure	1,0
I-Inositol	2,0
Nicotinamid	1,0
Pyridoxal-HCL	1,0
Riboflavin	0,1
Thiamin-HCL	1,0

PBS (Phosphat Buffered Saline)-Puffer:

KCL	0,2 %
NaCl	8,0
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,4
KH ₂ PO ₄	0,2
pH 7,30	

Elektroporationspuffer:

	50 mM
K ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	
K-Acetat	20
pH 7,35	

Magnesiumsulfatlösung

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 M
pH 7,67	

Extrazellulärflüssigkeit (340 mOsm/l)

NaCl	162,00 mM
KCl	5,30
NaH ₂ PO ₄	0,67
KH ₂ PO ₄	0,22
HEPES	15,00
Glucose	5,60
CaCl ₂	2,00
pH 7,35	

Intrazellulärflüssigkeit (340 mOsm/l)

KCL	140 mM
MgCL ₂	2
EGTA	11
HEPES	10
Glucose	10
pH 7,30	

11.2. Verbrauchsmittel

Petrischalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Mümbrecht, BRD
Petrischalen (35 x 20 mm)	Sarstedt, Mümbrecht, BRD
Borosilikat Glaspipetten (GC150TF-10)	Clark Elektromedical. Instr. Pangbourne Reading, GB

11.3. Geräte

Zellkultur

Digifuge GL
Lamin Air
Brutschrank IG 150

Haereus Intrumente, München, BRD
Haereus Intrumente, München, BRD
Jouan, Saint-Herblain, Frankreich

Patch-Clamp-Methode

Feinwaage SBC 32
Elektrodenziehgerät (DMZ-Universalpuller
Auflichtmikroskop Axiovert
Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B
Analog-Digital-Wandler
 Digidata 1200 A/D Converter
Piezokristall Minitranslator P-249.20

Scaltec Instr. GmbH, Göttingen, BRD
Zeitz Intrumente, Augsburg, BRD
Zeiss, Göttingen, BRD
Axon Instr. Inc., Forster City, CA, USA

Axon Instr. Inc., Forster City, CA, USA
Physik Instrumente, Waldbronn, BRD

EDV

Power Macintosh 7200/90
Vektra Pentium PC
pClamp 6.0 Software

AxoGraph 3 Software

SigmaStat 2.03 Software
Bioq 2.0 Software

Apple Computer, Cupertino, CA, USA
Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA
Axon Instruments Inc., Forster City, CA,
USA
Axon Instruments Inc., Forster City, CA,
USA
SPSS Science, Chicago. IL, USA
Parnas & Parnas, Neurobiology Lab,
Hebrew University, Jerusalem, Israel

12. Lebenslauf:

Name:	Michaela Beyerle
Geburtsdatum/ort:	10. September 1970, München
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schule:	
1977 - 1981	Grundschule
1981 - 1990	Luisengymnasium; Abitur
Auslandsaufenthalt:	
09.1990 - 06.1991	Brasilien (Krankenpflegepraktikum)
Studium:	
1992 - 1996	Studium der Wirtschafts-Geographie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1996 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
05.2003	3. Staatsexamen
Ärztin im Praktikum:	
seit 06.2003	Beginn des AIP: Anästhesie Krankenhaus Agatharied